

Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

UC-NRLF
B 3 778 048

Digitized by Google

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO



Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, L. Asher-Bern, G. Bertrand-Paris, A. Bickel-Berlin, F. Blumenthal-Berlin, A. Bonanni-Rom, F. Bottazzi-Neapel, G. Brodig-Karlsruhe i. B., A. Durig-Wien, F. Ehrlich-Breslau, H. v. Euler-Stockholm, J. Feigl-Hamburg, S. Flexner-New York, J. Forssman-Lund, S. Fränkel-Wien, E. Freund-Wien, H. Freundlich-Berlin-Dahlem, E. Friedberger-Greifswald, E. Friedmann-Berlin, O. v. Fürth-Wien, G. Galeotti-Neapel, F. Haber-Berlin-Dahlem, H. J. Hamburger-Groningen, P. Hári-Budapest, E. Häggiund-Åbo. A. Heffter-Berlin, V. Henri-Paris, V. Henriques-Kopenhagen, W. Heubner-Göttingen, R. Höber-Kiel, M. Jacoby-Berlin, A. Koch-Göttingen, F. Landolf-Buenos Aires, L. Langstein-Berlin, P. A. Levene-New York, L. v. Liebermann-Budapest, J. Loeb-New York, A. Loewy-Berlin, A. Magnus-Levy-Berlin, J. A. Mandel-New York, L. Marchlewski-Krakau, P. Mayer-Karlsbad, J. Meisenheimer-Greifswald, L. Michaelis-Berlin, H. Molisch-Wien, J. Morgenroth-Berlin, E. Münzer-Prag, W. Nernst-Berlin, W. Ostwald-Leipzig, W. Palladin-St. Petersburg, W. Pauli-Wien, R. Pfeiffer-Breslau, E. P. Pick-Wien, J. Pohl-Breslau, Ch. Porcher-Lyon, P. Rona-Berlin, H. Sachs-Heidelberg, S. Salaskin-St. Petersburg, A. Scheunert-Berlin, N. Sieber-St. Petersburg, S. P. L. Sörensen-Kopenhagen, K. Spiro-Liestal, E. H. Starling-London, J. Stoklasa-Prag, W. Straub-Freiburg i. B., A. Stutzer-Königsberg i. Pr., K. Suto-Kanazawa, H. v. Tappeiner-München, H. Thoms-Berlin, P. Trendelenburg-Rostock, O. Warburg-Berlin, W. Wiechowski-Prag, A. Wohl-Danzig, J. Wohlgemuth-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundzehnter Band



Berlin

Verlag von Julius Springer

1920

Digitized by Google

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

Digitized by Google

Inhaltsverzeichnis.

Seite

von Plotho, Olga. Der Einfluß kolloidaler Metallösungen auf niedere Organismen und seine Ursachen 1

— Der Einfluß der kolloidalen Metallösungen nach Übertragung des Pilzmycels aus verschiedenen Nährsubstraten 33

Ruszнyák, Stefan. Physikalisch-chemische Untersuchungen an Körperflüssigkeiten. Der Zustand des Chlors im Serum und Plasma. I. 60

Warburg, Otto und Erwin Negelein. Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen 66

v. Szent-Györgyi, A. Eine mikroskopische Überführungsmethode. Studien über Eiweißreaktionen. I. 116

— Die Wirkung der Elektrolyte auf das Serumalbumin. Studien über Eiweißreaktionen. II. 119

Köhler, Erich. Untersuchungen über den Ablauf der alkoholischen Gärung der Hefe. II. 128

Forssman, J. Der Ursprung des anaphylaktischen Schockes . . . 133

— Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektionen 164

Salén, Ernst. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. II. 176

Murschhauser, Hans. Die Mutarotation der Dextrose in Lösungen von sekundärem Natriumphosphat 181

Neuberg, Carl und Werner Ursum. Die dritte Vergärungsform des Zuckers als allgemeine Folge der Dismutationswirkung anorganischer und organischer Alkalisatoren 193

Berichtigung zur Mitteilung von S. Partos „Über einen neuen hämatinartigen krystallisierten Körper“ 216

Muneo Kumagawa †

Michaelis, L. und M. Rothstein. Zur Theorie der Invertasewirkung 217

Fränkel, Sigmund und Karoline Zeimer. Über das Imidazolisopiperidin und seine Derivate 234

Atzler, Edgar und Erich Döhring. Physikalisch-chemische Beiträge zum Problem der Blutgerinnung 245

Weiß, M. Colorimetrische Phenolbestimmung im Harn 258

König, Adolf. Untersuchungen über den Einfluß von Temperaturen auf Fermente, besonders von Lab und Pepsin 266

Fränkel, Sigmund und Ernst Nassau. Über ein tryptophanhaltiges Tripeptid aus Casein 287

Freudenberg, E. und P. György. Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. I. 299

Alday-Redonnet, Th. Sensibilisierung des Trendelenburgschen Froschpräparates zur Adrenalinmessung 306

Druckfehlerberichtigung zu dem Beitrag von E. Salkowski „Über die antiseptische Wirkung einiger Chlorderivate des Methans, Äthans und Äthylens“ 319

Autorenverzeichnis 320

141711

Digitized by Google

Digitized by Google

Der Einfluß kolloidaler Metallösungen auf niedere Organismen und seine Ursachen.

Von

Olga von Plotho.

(Arbeiten aus dem landwirtschaftl. bakteriolog. Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 15. Juni 1920.)

Einleitung.

Vor fast 60 Jahren stellte Th. Graham[1]) zahlreiche Untersuchungen über die Diffusion verschiedener Lösungen durch tierische Membranen an und teilte auf Grund der beobachteten ungleich großen Diffusionsgeschwindigkeiten die gelösten Körper ein in Krystalloide und Kolloide.

Er glaubte hiermit zwei einander völlig entgegengesetzte Arten der Materie bezeichnet zu haben und drückte das aus in den berühmt gewordenen Worten von den „verschiedenen Welten der Materie". „Der Unterschied zwischen diesen beiden Arten von Materie ist der, welcher zwischen dem Material eines Minerals und dem einer organisierten Masse besteht"[2]). Heute wissen wir, daß es Übergänge gibt, die die großen Gruppen der echten Lösungen, der echten Kolloide und der bloßen Aufschwemmungen unlöslicher Stoffe in einem Lösungsmittel, der Suspensionen, miteinander verbinden; wir wissen ferner, daß der gleiche Stoff, je nach dem Lösungsmittel, einmal in kolloidalem, das andere Mal in krystalloidem Zustande vorliegen kann, und es ist daher angezeigt, nicht von kolloidalen Stoffen, sondern von kolloiden Systemen oder von einem kolloidalen Zustande zu sprechen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir es ausschließlich mit Stoffen in diesem Zustande zu tun, und wir teilen sie am besten mit Zsigmondy[3]) nach chemischen Gesichtspunkten ein in organische und anorganische Kolloide.

---

[1]) Graham, Liquid Diffusion applied to Analysis. Phil. Transactions of the Roy. Acad. of London 1862.

[2]) Zitiert nach: Engelen, Über die wissenschaftlichen Grundlagen der Fulmargintherapie. Ärztl. Rundschau 1912/13.

[3]) Zsigmondy, Kolloidchemie. 2. Aufl. 1918. S. 37

Digitized by Google

Zu den Systemen der ersten Art gehören alle Membransubstanzen, Schleime, Gallerten, Grenzschichten der Zellen und das Protoplasma[1]) der Organismen. Sie alle sind hydrophile Kolloide (Perrin), speziell Hydrogele (Graham), die ihrem Lösungsmittel Wasser gegenüber „hydrophil" sind, d. h. Wasser anlagern[2]). Ihnen gegenüber stehen als anorganische Kolloide die verwendeten Metalle. Sie sind in ihrem Lösungsmittel außerordentlich fein zerteilt, so daß die Teilchen von Papierfiltern nicht zurückgehalten werden. Mit Ausnahme eines speziellen Goldsols, das sogleich besprochen werden wird[3]), sedimentieren sie auch nach monatelangem Stehen nicht und zeigen schwachen osmotischen Druck[4]), sowie geringes Diffusionsvermögen. Sie erfüllen also die Forderungen, die an kolloidale Lösungen zu stellen sind[5]). Das Dispersionsmittel ist in unserem Fall überall Wasser, die Lösungen sind daher als Hydrosole zu bezeichnen (Graham). Unter ihnen ist keins so systematisch und so erfolgreich untersucht wie das Goldhydrosol. Zu seiner Darstellung sind die verschiedensten Methoden angegeben worden, und an ihm sind Natur und Eigenschaften der kolloidalen Metalle überhaupt weitgehend erforscht.

Eine große Bedeutung haben auch die kolloidalen Silberlösungen, vor allem wegen ihrer seit einiger Zeit in der Therapie verwendeten bakterientötenden Wirkungen, die an Intensität denen des kolloidalen Kupfers vielleicht wenig nachstehen.

In den vorliegenden Untersuchungen wird eine vergleichende Beobachtung des Einflusses dieser drei Arten von Hydrosolen auf niedere Organismen durchgeführt, und die Ursachen desselben soweit als möglich dargelegt.

Über den Einfluß, den eine kolloidale Goldlösung auf niedere Organismen, speziell auf Schimmelpilze ausübt, lagen schon einige Mitteilungen vor, die sich auf die Tatsache beziehen, daß Schimmelpilze das Gold auf oder in ihrer Membran verdichten. Zsigmondy[6]) schreibt darüber, daß in fast sämtlichen seiner Lösungen von metallischem Golde sich nach ein- bis zweiwöchigem Stehen kleine Kulturen von Schimmelpilzen fanden, die in einigen Fällen zu größeren Gebilden auswuchsen, während die Flüssigkeit, in der die Pilze wucherten, immer heller wurde. Er sagt wörtlich: „In einem 200 ccm fassenden Kölbchen war die Goldlösung ganz entfärbt worden, und ich sah zu meiner Verwunderung, daß kein Gold sich am Boden des Gefäßes abgesetzt hatte, wohl aber, daß das Mycelium des Pilzes schwarz erschien. Dies

[1]) Berthold, Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig 1886.

[2]) Höber, Physikal. Chemie der Zelle und der Gewebe. 4. Aufl. Leipzig u. Berlin 1914.

[3]) S. 4.

[4]) Zsigmondy, Bemerkungen z. d. Abhandlg. „Über d. Natur d. sog. kolld. Metallösungen". Zeitschr. f. physik. Chemie **33**. 1900.

[5]) Zsigmondy, Über „Lösungstheorie" und „Suspensionstheorie". Kolloid-Zeitschr. **26**, H. 1, 1920.

[6]) Zsigmondy, Liebigs Annalen der Chemie. Leipzig. **301**. 1898.

Digitized by Google

ließ in mir die Vermutung entstehen, daß der Schimmelpilz bei seinem Lebensprozeß das Gold aus der Lösung aufgenommen und in seinem Mycelium verdichtet hatte. Ich nahm daher eine kleine Probe davon aus der Flüssigkeit und beobachtete sie unter dem Mikroskop. Das Mycelium erschien als ein Gewirre schwarzer Fäden, man konnte aber auch einige tief dunkelrote Fäden darunter bemerken."

Vor kurzer Zeit erschien dann eine Arbeit von Maud Williams[1]), die Penicillium glaucum und Oidium lactis in nach verschiedenen Verfahren hergestellten Goldlösungen zog und die Einlagerung des Metalls in den Hyphen beobachtete. Ihre Untersuchungen sind wenig exakt. Sie arbeitete z. B. unterschiedslos mit geschützten und ungeschützten Hydrosolen, anscheinend ohne sich der grundlegenden Verschiedenheiten in den Eigenschaften solcher Lösungen bewußt zu sein. Ebensowenig gibt sie an, ob ihre Hydrosole alkalische oder neutrale oder schwach saure Reaktion zeigten. Sie fand eine feste Verankerung des Goldes in der Membran von Penicillium glaucum und Oidium lactis und stellte in Paraffinschnitten Färbung in der ganzen Membran fest. Ich werde auf diese Publikation noch zurückkommen.

Außerdem liegt eine kurze Mitteilung von Friedenthal[2]) über die Speicherung des Goldes im Mycel der Schimmelpilze vor. Es geht aus ihr hervor, daß er die Speicherung wohl gesehen, aber nicht näher beobachtet hat. Er glaubt, sie käme nur an toten oder absterbenden Hyphen zustande.

Über den Einfluß kolloidaler Silber- und Kupferlösungen auf niedere Organismen ist mir keine Mitteilung in der Literatur bekannt geworden. Es liegen eine Reihe von Untersuchungen über die Wirkung von Silber und Kupfer auf Bakterien aus der medizinischen Literatur vor[3]). Diese Untersuchungen wurden aber nicht mit kolloidalen Lösungen, sondern zum Teil mit den reinen Metallen, zum Teil mit deren Verbindungen angestellt.

Über den Verbleib der Teilchen aus kolloidalen Silber- und Jodsilberlösungen in dem Körper höherer Tiere stellte Voigt[4]) sehr interessante Untersuchungen an. Er bediente sich dabei einer von ihm angegebenen Dunkelfeldmethode mit Hilfe des Paraboloidkondensors[5]). Auf diese Weise waren noch Metallteilchen erkennbar, die im Hellfeld des Mikroskops nicht mehr

---

[1]) Williams, Absorption of gold from colloidal solutions by Fungi. Ann. of Bot. 32 1918.

[2]) Friedenthal, Über kolld. Silberlösung und ihre Anwendung in der Heilkunde. Therap. d. Gegenwart 1918.

[3]) Matsunaga, Experimentelle Untersuchungen über die bactericide Wirkung der Metalle Cu und Ag „in vivo". Bakt. Centralbl. 82. — Christians, Die Bedeutung gediegener Metalle als Desinfektionsmittel. Desinfektion 1911, S. 217. — Bitter, Absterben von Bakterien auf wichtigeren Metallen und Baumaterial. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankheiten 1911.

[4]) Voigt, Über die Wirkg. d. kolld. Jodsilbers im Säugetierkörper. Biochem. Zeitschr. 98. 1918.

[5]) Voigt, Biolog. Untersgen. über kolld. Silber mittels einer neuen Methode z. Nachweis feinster Metallablagerungen in d. Organen. Dtsch. med. Wochenschr. 1914. Nr. 10

Digitized by Google

beobachtet werden konnten. Ich wandte diese Methode gleichfalls an, doch gelang es mir nicht, im Dunkelfeld Metallteilchen in den Membranen nachzuweisen, die nicht auch im Hellfeld sichtbar gewesen wären.

Ausgangsmaterial.

I. Die Nährsubstrate.

a) Die Kolloide.

Die von mir verwendeten Goldlösungen und die Kupferlösung wurden mir zunächst alle von Herrn Prof. Zsigmondy liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt, wofür ich ihm zu großem Danke verpflichtet bin. Später stellte ich mir das am häufigsten gebrauchte Hydrosol nach der von Zsigmondy[1]) genau beschriebenen Phosphormethode selber her. Es besitzt einen Metallgehalt von 0,003%. Die Lineardimension der Teilchen beträgt durchschnittlich 2—6 $\mu\mu$. Die Lösung ist also eine außerordentlich fein disperse. Ich werde sie im folgenden mit Au_4 bezeichnen. Ihre Farbe ist hochrot, sie zeigt weder im auffallenden noch im durchfallenden Licht die geringste Trübung. In dünner Schicht unter dem Mikroskop ist Au_4 bei gewöhnlichem Tageslicht auch bei den stärksten Vergrößerungen vollständig homogen und farblos. Die Reaktion ist ganz schwach alkalisch. Bei der Herstellung wurde ihr und den andern verwendeten Goldlösungen kein Schutzkolloid zugesetzt. Wie bei allen drei Arten von Metallösungen besitzen die ungeschützten Teilchen eine negative Ladung.

Eine zweite, viel seltener verwendete Goldlösung unterscheidet sich von der eben beschriebenen durch die Methode ihrer Herstellung und die etwas größere lineare Dimension ihrer Teilchen. Diese beträgt etwa 8 $\mu\mu$. Das im auffallenden sowie im durchfallenden Lichte schön rote, absolut klare, in dünner Schicht farblose Hydrosol hat ebenfalls einen Goldgehalt von 0,003%, ist aber hergestellt mit Hydroxylamin als Reduktionsmittel[2]). Seine Reaktion ist neutral, bis ganz schwach sauer. Es ist sehr empfindlich und koaguliert schon beim Schütteln in einem Reagensglase, wenn dieses mit dem Finger verschlossen wird. Durch diese übergroße Empfindlichkeit wird das Arbeiten mit ihm sehr erschwert. Es sei mit Au_8 bezeichnet.

[1]) Zsigmondy, Zur Erkenntnis d. Kolloide. Jena 1905.
[2]) Zsigmondy, Kolloidchemie. 2. Aufl. 1918. S. 157.

Digitized by Google

Die gleiche große Empfindlichkeit zeigt ein drittes, stark getrübtes, im durchfallenden Lichte hellrotes, im auffallenden Lichte „fluorescierendes", in dünner Schicht unter dem Mikroskop ebenfalls farbloses und homogenes Hydrosol, das Teilchen von 95 $\mu\mu$ Lineardimension enthält. Goldgehalt: 0,003%, Reaktion und Herstellung wie bei Au_8. Dieses Sol ist wenig haltbar, bereits nach einigen Tagen haben sich kleine Flocken von zusammengeballten Goldteilchen am Boden abgesetzt.

Sehr gut läßt sich mit einer Lösung experimentieren, die nach dem von Zsigmondy angegebenen Formolverfahren[1]) hergestellt ist. Konzentration und Farbe sind wie bei Au_4 und Au_8, die Teilchengröße beträgt jedoch ca. 40 $\mu\mu$. Ich werde diese Lösung daher mit Au_{40} bezeichnen. Sie ist, entsprechend der Teilchengröße, von geringerer Durchsichtigkeit, aber sehr gut haltbar. Ein beträchtliches Absetzen des Goldes am Boden des Gefäßes war auch nach monatelangem Stehen nicht eingetreten. Die Reaktion ist neutral.

Sämtliche Lösungen wurden in Gefäßen von Jenaer Glas unter sonst gleichen Bedingungen aufbewahrt.

Alle eben beschriebenen Goldlösungen sind ungeschützt. Ihnen gegenüber stehen die Metallsole des Silbers und Kupfers, die sich von ihnen, abgesehen von ihrem spezifischen Metallgehalt, durch ihren Charakter als geschützte Lösungen unterscheiden. Sie sind durch Zusatz von Schutzkolloiden z. T. in beträchtlicher Menge gegen den Einfluß von Elektrolyten stabilisiert. Bei weniger edlen Metallen als das Gold ist nämlich die Herstellung von schutzkolloidfreien Hydrosolen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, und schon die kolloidalen Silberlösungen ohne Schutzkolloid enthalten das Metall in viel gröberer Zerteilung, wodurch wieder die Lösung weniger haltbar und für therapeutische Zwecke, für die kolloidales Silber in letzter Zeit viel hergestellt wurde, unbrauchbar wird. Dasselbe gilt für das kolloidale Kupfer.

Von kolloidalem Silber verwendete ich drei Lösungen, die sich durch Konzentration des Metalls, Herstellungsart und Teilchengröße unterscheiden.

Für die Herstellung kolloidaler Metalle überhaupt sind zwei prinzipiell verschiedene Methoden angegeben worden: die Reduktion des Metalls aus

[1]) Zsigmondy, Kolloidchemie. 2. Aufl. 1918. S. 149.

Digitized by Google

einem seiner Salze mit Hilfe von chemischen Verbindungen als Reduktionsmittel und die Zerstäubung des reinen Metalls in Wasser durch den elektrischen Strom. Nach der ersten Methode, also mit Hilfe eines chemischen Reduktionsmittels, ist das kolloidale Silber, das unter dem Namen „Kollargol" bekannt ist, hergestellt. Es enthält ein Schutzkolloid aus „Abbauprodukten der Eiweißkörper" in beträchtlicher Menge (25%). Sein Metallgehalt beträgt 1,5%, ist also erheblich höher als bei den Goldlösungen. Die Lineardimension seiner Teilchen ist nach Angabe der Fabrik etwa 20 $\mu\mu$. Es ist im auffallenden und durchfallenden Licht eine schwarzbraune Flüssigkeit, unter dem Mikroskop auch in dünner Schicht noch hellbraun und nicht sehr homogen. Häufig kommen kleine Flocken zusammengeballten Silbers in das Gesichtsfeld.

Elektrokollargol wird durch elektrische Zerstäubung hergestellt. Es enthält einen geringeren Grad von Schutzkolloid[1]) als das Kollargol[2]); immerhin aber noch so viel, daß es große Mengen von Säuren ohne Schaden aushält. Seine Homogenität ist weitaus größer als die des Kollargols. Es ist eine klare tiefrotbraune Flüssigkeit, unter dem Mikroskop in dünner Schicht hellbräunlich. Der Gehalt an Silber ist geringer als beim Kollargol, er beträgt 0,6%. Der Teilchendurchmesser ist ebenfalls nach Angaben der Fabrik etwa 10 $\mu\mu$.

Auf die gleiche Weise, nämlich durch elektrische Zerstäubung, wird das Fulmargin hergestellt. Ihm ist ebenfalls ein Schutzkolloid, nach Engelen[3]), „etwas Gummi" zur Stabilisierung zugesetzt. Der Teilchendurchmesser beträgt ca. 14 $\mu\mu$. Es enthält 0,1% Silber. Seine Farbe ist im auffallenden und durchscheinenden Licht tiefbraun, in mikroskopischer Schicht hellbraun. Es ist von weitgehender Homogenität[4]).

Die Farbe der verwendeten Kupferlösung ist tief braungrau, in mikroskopischer Schicht jedoch nur schwach bräunlich. Sie ist nach der von Paal[5]) angegebenen Methode mit Hilfe von lysalbinsaurem Natrium hergestellt. Konzentration und Teilchengröße sind mir nicht bekannt. Die Lösung zeigt bei gewöhnlicher Beleuchtung unter dem Mikroskop auch bei stärksten Vergrößerungen vollständige Homogenität. Sie enthält, entsprechend ihrer Herstellungsart, ein gut schützendes Schutzkolloid.

Was die Stabilität dieser letzten vier Lösungen betrifft, so ist sie, dank den zugesetzten organischen Kolloiden, bei allen eine sehr große. Die elektrisch hergestellten Silberlösungen sind

---

[1]) Nach Carl, Med. Klin. 1919, Nr. 7 einen Zusatz von 10% eines indifferenten Eiweißkörpers.

[2]) Moewes, Therap. d. Gegenw. 1917.

[3]) Engelen l. c.

[4]) Für Übersendung der Silberpräparate sowie auf sie bez. Literatur habe ich der chem. Fabrik Heyden in Radebeul b. Dresden u. dem chem. Lab. Rosenthal in Freibg. zu danken.

[5]) Paal, Über kolld. Gold, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 35. (II) 2236. 1902. — Über kolld. Silberoxyd. S. 2224.

Digitized by Google

stabiler als das Kollargol, sie lassen auch nach Zusatz von $^n/_{10}$-H_2SO_4 in fünffacher Menge ihres Volums das Metall nicht fallen. Das Elektrokollargol ist im Vergleich mit dem Fulmargin etwas empfindlicher. Am empfindlichsten ist das kolloidale Kupfer. Aus 1 ccm seiner Lösung hat sich nach Zusatz von $115 \cdot 10^3$-Milliäquivalent $^n/_{10}$-H_2SO_4 nach kurzer Zeit ein brauner, flockiger Niederschlag abgesetzt, der fast sämtliches Kupfer enthält, denn die überstehende Flüssigkeit ist nahezu farblos. Im Vergleich zu den Goldlösungen[1]) sind aber auch hier enorme Mengen von Elektrolyten nötig, um Koagulation zu bewirken. Ein Farbumschlag der Lösung nach Zusatz der Säure trat nicht ein.

b) Die Zusätze zu den Kolloiden.

Da mir für vergleichende Untersuchungen in erster Linie daran gelegen sein mußte, möglichst gleiche Bedingungen in den Nährmedien zu erzielen, so setzte ich zu den ungeschützten Goldlösungen in Vergleichskulturen mit Silber oder Kupfer stets organische Kolloide als Schutz hinzu. In den in den Tabellen III bis V aufgeführten Kulturen ist der Schutz der Goldlösung immer herbeigeführt durch Gelatine, und zwar ist 0,05% Gelatine hinzugefügt, entsprechend dem Schutz der am wenigsten geschützten Silberlösung, der gleichfalls 0,05% beträgt. In anderen Fällen, in denen es mir darauf ankam, die Abhängigkeit der Metallspeicherung von dem Grad des Schutzes festzustellen, wurde als Schutzkolloid außer Gelatine auch Dextrin verwandt. Genaueres über diese Versuche wird später berichtet werden. Durch das Hinzufügen der organischen Kolloide war erst die Möglichkeit gegeben, einerseits die Wirkung der geschützten und ungeschützten Goldlösung, und andererseits die Wirkungen der geschützten Lösungen des Goldes, des Silbers und des Kupfers auf die Organismen zu vergleichen. Hierzu mußte außerdem der Metallgehalt der Lösungen der gleiche sein, denn falls irgendeine Wirkung bei der Kultur in ihnen an den Organismen bemerkbar wurde, war es wahrscheinlich, daß sie dem Grade nach mit bedingt würde von der Menge der Metallteilchen, resp. der an ihnen adsorbierten Ionen. Ich verdünnte daher die Silberlösungen mit sterilem destilliertem Wasser entsprechend so sehr, daß ihr Metallgehalt dem der Goldsole gleichkam, d. h. 0,003% betrug.

[1]) Galecki, Zeitschr. f. anorg. Chemie 1912, Bd. 74.

Digitized by Google

Die Entwicklung der Kulturen war in allen geschützten und ungeschützten Lösungen ohne weitere Zusätze stets eine kümmerliche. Um eine bessere Entwicklung zu erzielen, fügte ich daher Zusätze von Nährsubstraten hinzu. Wie die Erfahrung lehrte, mußte, wenn eine meßbare Beeinflussung des Wachstums erzielt werden sollte, das Nährmedium wenn möglich im Verhältnis 1:10 zu den Kolloiden hinzugefügt werden (10 Teile Kolloid, 1 Teil Nährsubstrat). Als Nährmedium wählte ich, da in ihm die meisten Organismen gut gediehen, Bierwürze und außerdem eine künstliche Nährlösung, deren Zusammensetzung sogleich beschrieben werden soll, und die als Ammonnitratlösung bezeichnet sei.

Jetzt machte sich aber bei den ungeschützten Goldlösungen die Empfindlichkeit gegen Elektrolyte unangenehm bemerkbar. Den Zusatz der Ammonnitratlösung im Verhältnis 1:10 (10 Teile Kolloid, 1 Teil Nährlösung) hielten Au_4 und Au_{40} aus, ebenso einen gleichen Zusatz einer bestimmten Würze. Bei einer zweiten, in gleichem Verhältnis zugesetzten koagulierten jedoch beide. Als Grund hierfür ergab sich ihr höherer Säuregrad, wie aus Tabelle I zu ersehen ist. Als Indicator wurde stets Methylrot in alkoholischer Lösung verwendet.

Tabelle I.

Beeinflussung der Goldlösung durch Würzezusatz.

Nährsubstrat	Zur Neutralisierung von 10 ccm verbraucht an Baryt: [28,5 ccm Baryt = 10 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4]	Zusatz zu Au_{40} im Verhältnis 1:10	Zusatz zu Au_{40} im Verhältnis 1:20
Ammonnitratlös.	1,7 ccm	koaguliert nicht	koaguliert nicht
Würze I	1,8 „	„ „	„ „
Würze II	2,6 „	koaguliert	„ „

Es wurde daher die Ammonnitratlösung im Verhältnis 1:10, die Würze jedoch immer im Verhältnis 1:20 zugesetzt (20 Teile Kolloid, 1 Teil Würze).

Au_8 und Au_{95} vertrugen weder Würze noch Nährlösung in irgendeinem Verhältnis, welches das Wachstum der Kulturen meßbar beeinflußte. Nach genauer Neutralisierung der Würze mit K_2CO_3 gelang es, Würze und Au_8 im Verhältnis 1:20 zu mischen, ohne daß ein Farbenumschlag in der Goldlösung eintrat.

Digitized by Google

Die eingesäten Sporen keimten auch, aber mir schien besonders in den Einzellkulturen doch eine merkbare Beeinflussung der Entwicklung zu resultieren: deshalb unterließ ich den Zusatz von Würze zu den beiden Lösungen.

Da mir aber daran lag, besonders in der Lösung mit den großen Goldteilchen einige Kulturen zu ziehen, versuchte ich den Zusatz eines Nichtelektrolyten. Als solchen, voraussichtlich nicht fällenden, wählte ich Rohrzucker, und es erwies sich, daß bei den Kolloiden Au_8 und Au_{95} ein Zusatz von 2% Rohrzucker einerseits mikroskopisch keine Veränderung im Hydrosol hervorrief und andererseits das Wachstum von Aspergillus niger und das eines häufig verwendeten, später beschriebenen Penicilliums meßbar begünstigte.

Welche Quelle hier die Pilze zur Befriedigung besonders ihres Stickstoffbedürfnisses heranzogen, sei dahingestellt[1]). Einen Teil der anderen unentbehrlichen Substanzen fanden sie in großer Verdünnung in der Goldlösung.

Die anderen Kolloide vertrugen den Zusatz aller Nährmedien in jedem der beschriebenen Verhältnisse, die in den Vergleichskulturen gewahrt wurden. Zu anderen Zwecken wurden dann größere Portionen von Nährsubstraten hinzugefügt, worüber später zu berichten sein wird.

Es bleibt noch ein Zusatz zu der Lösung Au_4 zu erwähnen, der einer geringen Menge von Oxalsäure. Durch ihn gelingt es, die Wechselwirkung zwischen Goldlösung und Membransubstanz in einigen Fällen entscheidend zu beeinflussen. Die Goldlösung verträgt ohne Veränderung einen Oxalsäuregehalt von 0,045%. Es liegt in ihrer Natur begründet, daß sie nicht in höherem Grade von den Wasserstoffionen beeinflußt wird. Die Ladung ihrer Teilchen ist nämlich durch eine geringe Menge von Alkali erhöht[2]), und die Lösung dadurch stabilisiert. In der in Frage stehenden Goldlösung stellte ich einen Gehalt von 0,0213% K_2CO_3 fest, und auf ihn ist die Möglichkeit des relativ großen Zusatzes von Oxalsäure ohne Koagulationswirkung zurückzuführen[3]).

---

[1]) Saida, Ber. d. dtsch. bot. Ges. **19**, 107. 1901.

[2]) Zsigmondy, Einige bemerkensw. Eigenschaften d. kolld. Goldes. Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **96**. 1916.

[3]) Zsigmondy, Über Koagulation u. Teilchenattraktion. Zeitschr. f. physikal. Chemie. **42**, H. 5. 1918.

Digitized by Google

c) Die künstlichen Nährlösungen.

Wie erwähnt wurden die kolloidalen Lösungen mit den Zusätzen und ohne die beschriebenen Zusätze als Nährmedien verwandt. Es erwies sich jedoch als notwendig, die Pflanzen erst in einem Substrat, dessen Zusammensetzung bekannt war, und dessen Reaktion genau verfolgt werden konnte, zu kultivieren und sie dann zu einem bestimmten Zeitpunkte in die Kolloide zu übertragen.

Die am häufigsten verwendete, von Wehmer[1]) angegebene Nährlösung, in der fast alle niederen Pflanzen wuchsen, bezeichne ich als Ammonnitratlösung. Sie hat folgende Zusammensetzung: 1 g Ammonnitrat, 0,5 g prim. Kaliumphosphat, 0,25 g kryst. Magnesiumsulfat, 100 ccm Wasser: dazu als Kohlenstoffquelle 3—$7^1/_2$ g Rohrzucker oder Dextrose.

Von gleicher Zusammensetzung, nur mit 1 g Ammonsulfat als Stickstoffquelle, anstatt des Ammonnitrates, ist eine zweite Lösung, die als Ammonsulfatlösung bezeichnet sei.

Von Nikitinsky[2]) wurden zwei Lösungen angegeben, die ich häufig benutzte; sie seien als Nikitinsky-Lösung I und II bezeichnet. Ihre Zusammensetzung ist die folgende: Lösung I: 3 g weinsaures Kali, 1 g Ammonnitrat, 0,5 g prim. Kaliumphosphat, 0,25 g Magnesiumsulfat. Lösung II: 1 g Ammontartrat, 0,5 g prim. Kaliumphosphat, 0,25 g Magnesiumsulfat. — In der ersten Lösung dient das weinsaure Kalium als Kohlenstoffquelle, in der zweiten wirkt das Ammontartrat zugleich als Stickstoff- und als Kohlenstoffquelle.

Außerdem benutzte ich für höhere Pflanzen die als „Sachssche Nährlösung" bekannte: 1 g Kaliumnitrat, 0,5 g Calciumsulfat, 0,5 g Magnesiumsulfat. 0,5 g saures Calciumphosphat, 1000 ccm Wasser, eine Spur Eisen.

Zu diesen Lösungen wurden Zusätze von Säuren und Alkalien gemacht, die später besprochen werden sollen.

II. Untersuchte Organismen.

Es wurden auf ihr Verhalten in den Metallhydrosolen geprüft:

1. Niedere Pflanzen.

a) Bakterien: Bacillus megatherium, Bacillus brassicae; Schwefelbakterien: Beggiatoa minima; Eisenbakterien: Clonotrix fusca, Leptotrix sp.

b) Algen: Cyanophyceen: Nostoc. sp., Conjugaten: Zygnema sp.;. Diatomeen: Diatoma vulg. Navicula sp.; Chlorophyceen: Protococcalesart.; Rhodophyceen: Batrachospermum moniliforme.

c) Pilze: Phycomyceten: Mucor mucedo. Eumyceten; Ascomyceten: Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Penicillium

[1]) Wehmer, Ber. d. dtsch. bot. Ges. **9**, 163. 1891.

[2]) Nikitinsky, Jahrb. f. wissensch. Botanik. **40**. 1904.

Digitized by Google

glaucum[1]), Penic. A, brevicaule, Hohenheim, purpurogenum, olivaceum, viridicatum, II, Z, Citromyces glaber. Basidiomyceten: Ustilago Hordei. Saccharomyceten: gärende Hefe, Kahmhefe. Sonstige Pilze: Botrytis vulg., Monilia variabilis, Dematium pullulans, Oidium lactis. Fusarium sp.

2. Höhere Pflanzen.

Gerste, Weizen, Hafer, Roggen.

3. Niedere Tiere.

Protozoen: Amöben, Colpidien, Paramaecium sp.

Hierzu sei kurz bemerkt, daß die Pilze in erster Linie für die Untersuchungen in Betracht kamen, weil sie sich als das reaktionsfähigste Material erwiesen. Von Algen wählte ich nur solche, die eine mehr oder weniger dicke Schleimschicht um ihren Körper ausbilden. Diese Schleimsubstanzen sind keine einheitlichen Gebilde; der Schleim der Cyanophyceen weicht in seiner Zusammensetzung von dem der Chlorophyceen und dieser wieder von dem der Rotalgen ab, ebenso ist die Gallertmasse der Zygnemaceen ein von den übrigen abweichendes Gebilde. So war es einer Prüfung wert, die Metallspeicherung in diesen Substanzen zu beobachten. Die Diatomeen zog ich deshalb in den Kreis der Untersuchungen, weil von ihnen bekannt ist, daß sie auf der Schale nach außen hin einen Plasmastreifen besitzen[2]). Da die Eisenbakterien in ihrer gallertartigen Hülle Verbindungen des Eisens, spez. das kolloide Eisenhydroxyd[3]) speichern, so lag es nahe zu untersuchen, ob sich bei ihnen auch die Speicherung eines anderen Metalls nachweisen ließ. Die Kulturen wurden mir von Herrn Prof. Lieske freundlichst überlassen.

Morphologische und physiologische Untersuchungen.

I. Die Wirkung der verschiedenen Lösungen auf niedere Organismen in Ein- und Vielzellkulturen.

Seit einiger Zeit ist es bekannt, daß sich in den nach den verschiedensten Verfahren hergestellten kolloidalen Goldlösungen Schimmelpilze ansiedeln, und daß diese das Metall in ihrem Mycel verdichten. Die Beobachtungen Zsigmondys sind auf S. 2 ausführlich wiedergegeben, ich

[1]) Als Penicilliumformen bezeichne ich die Schimmelpilze, die dem hiesigen Institut von Herrn Prof. Wehmer, Hannover, überlassen worden waren, und die unter diesem Namen schon in einer aus dem hiesigen Institut stammenden Dissertation (Wöltje, Centralbl. f. Bakt. 48, II) beschrieben wurden.

[2]) Engelmann, Botan. Ztg. 1879.

[3]) Adler, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 11 (II). 1903. Lieske, Jahrb. f. wissensch. Botanik. 50 (III). Molisch, D. Eisenbakterien. 1910.

Digitized by Google

kann daher auf die Beschreibung der äußeren Erscheinungen hier verzichten. Über den genauen Verlauf der Metalleinlagerung wird später berichtet werden.

Um das Verhalten der Pflanzen in den verschiedenen Lösungen kennen zu lernen, wurde eine große Reihe von Kulturen angelegt, die teils nur eine Spore, teils deren mehrere enthielten.

Sehr häufig benutzte ich als Züchtungsobjekt ein aus Gold isoliertes, durch sein hohes Säurebildungsvermögen ausgezeichnetes Penicillium, das ich mit Penicillium A bezeichne. Es bildet fahl gelbgrüne, später graugrüne Rasen mit ebener Oberfläche. Auf Gelatine ist die Farbe von vornherein mehr graugrün. Die Gelatine fängt am 4. Tage bei einer Temperatur von 15—18° C an, flüssig zu werden und ist nach 6 Tagen vollständig verflüssigt. Die Konidienabschnürung wird hier außerordentlich reichlich, so daß die Decke stark körnelig erscheint. Die Unterseite der Decken ist in Ammonnitratlösung und auf Gelatine grauweiß. Der Geruch ist ein typischer Schimmelgeruch. Die Nährlösung wird ziemlich stark angesäuert. Hierdurch unterscheidet sich das beschriebene Penicillium u. a. erheblich von dem viel schwächer säuernden Penicillium glaucum meiner Sammlung. Die Konidienträger sind meist mehrfach verästelt und an den Spitzen pinselförmig verzweigt. Mycel und Konidienträger sind 4—7 μ breit. Die Konidienträgeräste, an denen die Sterigmen sitzen, die Metulae[1]), sind 3—3,5 μ dick, 8—10 μ lang, die Sterigmen sind 15—17 μ lang und 2—3,5 μ breit. Die Sporen sind rund und haben einen Durchmesser von 2,8—3,5 μ. Das Optimum der Wachstumstemperatur liegt bei 18° C. Trotz unzähliger Überimpfungen blieb das Penicillium vollständig konstant.

Die Einzellkulturen wurden nach der von Lindner[2]) angegebenen Methode angelegt, derart, daß auf das Deckgläschen über der Linse eines hohlgeschliffenen Objektträgers eine Anzahl kleiner Tropfen gebracht wurde, die mit je einer Spore beimpft wurden. Nach Bezeichnung der Tröpfchen, in denen auf Grund mikroskopischer Kontrolle nur eine Spore sich befand, wurde deren Entwicklung fortlaufend beobachtet.

Die Vielzellkulturen wurden auf plangeschliffenen Objektträgern gezogen, bei denen das Deckgläschen durch ganz dünn ausgezogene Glasstäbchen gestützt wurde. Ich bezeichne daher diese Kulturen als „Stützkulturen". Bei einer Aussaat von mehreren Sporen in einer solchen Stützkultur war die Entwicklung besser als im hängenden Tropfen eines hohlgeschliffenen Objektträgers, und dieser Vorteil überwog den Nachteil, daß die Stützkulturen nicht immer frei von Verunreinigungen blieben. Präparate, die durch Bakterien verunreinigt waren, wurden aber sofort ausgeschieden.

Im folgenden soll die Einwirkung der Gold- und Silberlösungen auf einige Pilze genauer beschrieben werden; die Kupferlösung ist nicht hinzugezogen worden, weil es nicht möglich war, sie auf den gleichen Metallgehalt zu bringen, denn, wie erwähnt, war ihre Metallkonzentration nicht bekannt.

---

[1]) Haenicke, Zeitschr. f. Bot. 8. 1916.

[2]) Lindner, Mikrosk. Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. 1901.

Digitized by Google

Tabelle II.

Verhalten von Aspergillus niger in verschiedenen Lösungen ohne Metallkolloid.

Temperatur 10—20° C Nährsubstrat	Durchschnittl. Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung in Einzellkulturen				Durchschnittl. Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung in Vielzellkulturen			
	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.
Steril. Wasser (destilliert)	nicht gekeimt	nicht gekeimt	5	10—15	nicht gekeimt	15—20	70—80	80—100
Ausgefallene Goldlösung	„	„	5—10	15—20	„	20—25	80—100	100—120
Würze + Wasser 1 : 20	„	20—25	60	100—150	„	20—30	120—150	250—350
Wasser + 2% Rohrzucker	„	20	50—60	80—100	5—15	50—80	150	200—250
Ammonnitratlösung + Wasser 1 : 10	50—100	400—500	800—850	nicht meßb.*)	300—400	800	nicht meßbar	nicht meßbar
Ammonnitratlösung	300—400	800—900	nicht meßbar	„	300—700	800	„	„
Lösung I Nikitinsky	—	—	—	—	50—60	300—400	700—800	„
Lösung II Nikitinsky	—	—	—	—	nicht gekeimt	60—70	100—200	600—800

*) nicht meßbar = länger 1 mm.

In der Tabelle II sind die durchschnittlichen Ergebnisse einer Reihe von Beobachtungen an Aspergillus niger zusammengestellt. Sie zeigen seine vegetative Entwicklung in sterilem Aq. dest. und in diesem mit den gleichen Zusätzen der Nährmedien wie bei den Hydrosolen; außerdem in verschiedenen künstlichen Nährlösungen, die teils in der bei den Solen angewandten Verdünnung mit sterilem Aq. dest. teils unverdünnt mit Sporen beimpft wurden. Die Entwicklung von Pen. A und Mucor muc., die in den folgenden Tabellen ebenfalls aufgeführt ist, verläuft ganz ähnlich. Diese Tabelle gibt uns die Möglichkeit, etwa auftretende Beeinflussungen der Keimungszeit und des Längenwachstums durch die Metalllösungen beurteilen zu können, denn sie zeigt die Entwicklungsintensität, in den bei den Hydrosolen angewandten Verdünnungen der Nährlösungen, aber ohne Metallgehalt. Die in ihr gemachten Angaben über die Kulturen in sterilem Wasser und in der ausgefallenen Goldlösung sind in Vergleich zu setzen mit den Angaben der Tabelle III.

Aspergillus nig. ist in Einzellkulturen in sterilem Wasser nach 2 Tagen bei der angegebenen Temperatur noch nicht ausgekeimt. Die Sporen sind teilweise bis auf das Anderthalbfache des ursprünglichen Durchmessers (4—5 μ) gequollen. Am 3. Tage ist ein kleiner Keimschlauch entstanden, der sich vor dem Absterben noch etwas verlängert.

In den Vielzellkulturen ist die Entwicklung eine bessere. Nach 2 Tagen ist ein großer Teil der Sporen gekeimt, am kräftigsten diejenigen, die in einem kleinen Komplex zusammenliegen. Verzweigung und Querwandbildung tritt auch hier nicht auf; nach 5—6 Tagen sistiert das Wachstum.

Diese etwas bessere Entwicklung muß wohl auf die Tatsache zurückgeführt werden, daß immer ein größerer Teil der Sporen nicht auskeimt,

Digitized by Google

Tabelle III. Einzellkulturen in kolloidalen Lösungen

Name der Species	Ungeschützte Lösungen: Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung																Metallspeicherung
	Au_4				Au_{60}				Au_8				Au_{96}				
	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
Aspergillus niger	n.g.*)	n. g.	10	20—30	n. g.	n. g.	10	30	n. g.	n. g.	5—10	20—80	n. g.	n. g.	5	15—20	—
Penicillium A	„	„	5—10	20—30	„	„	10	20—30	„	„	5—10	20—80	„	„	5	20	—
Mucor mucedo	„	„	20—25	30—50	„	„	20	50—60	„	„	20	40—50	„	„	20—25	50	—

Vielzellkulturen in kolloidalen Lösungen

Aspergillus niger	5—10	30—50	100	180	10	50	100—120	150	5	40	100	150	5	40	80	100	Keimen schwach am 4. Tg. Aus 2. Tg.
Penicillium A	n. g.	20—30	80	140	n. g.	40	70	120—150	n. g.	40	70	120	n. g.	30—40	80	100	
Mucor mucedo	„	40—80	150	220	„	50—70	150	250	„	50—70	200	250—300	„	30—40	150	200—300	—

*) n. g. = nicht gekeimt.

Tabelle IV. Einzellkulturen in kolloidalen Lösungen + 2%

Name der Species	In ungeschützten Lösungen: Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung				Metallspeicherung	Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung				Metallspeicherung
	Au_4					Au_{96}				
	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.		n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
Aspergillus niger	n. gekeimt	10—20	50	80—100	—	n. gekeimt	15—20	50	100—120	—
Penicillium A	„	10—15	40—50	100	am 8. Tag	„	10	50	100	—
Mucor mucedo	„	30	70—80	200	—	„	30—40	70—80	200—250	—

Vielzellkulturen in kolloidalen Lösungen + 2% Rohr-

Aspergillus niger	10—20	50—80	150—200	800	am 3. Tag	10—20	30—40	150	250—300	am 4. Tg
Penicillium A	5—15	70—80	150	300—350	am 3. Tag	15—20	80	120—150	300—350	am 3. Tg
Mucor mucedo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Tabelle V. Einzellkulturen in kolloidalen Lösungen + Ammon-

Name der Species	In ungeschützter Lösung: Au_4 Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung				Metallspeicherung	In ge- Au_4 Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung				Metallspeicherung
	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.		n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
Aspergillus niger	100—200	400—500	800	n. meßb.*)	n. 2 Tg.	100—200	500	800—900	n. meßbar	—
Penicillium A	100—150	300—400	700—800	„	n. 2 Tg.	100—150	400	800	„	—
Mucor mucedo	150—200	800	n. meßbar	„	—	200—300	900	n. meßbar	„	—

Vielzellkulturen in kolloidalen Lösungen + Ammonnitrat-

Aspergillus niger	500—600	800	n. meßbar	n. meßbar	n. 2 Tg.	500—600	900	n. meßbar	n. meßbar	—
Penicillium A	300—400	600	„	„	n. 2 Tg.	400	700—800	„	„	—
Mucor mucedo	200—300	800—900	„	„	—	200—300	800—900	„	„	—

*) nicht meßbar = länger als 1 cmm.

Digitized by Google

ohne Zusatz Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

Geschützte Lösungen																Metall-speicherung
Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung																
Au_4				Elektrocollargol				Collargol				Fulmargin				
n. g.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
g.	n. g.	15—20	25—30	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	—
,	„	10	20—30	„	„	„	„	„	„	„	5	„	„	„	„	—
,	„	n. g.	50	„	„	„	10	„	„	„	20	„	„	„	20	—

ohne Zusatz. Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

,	40	100	140	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.	5	n. g.	n. g.	n. g.	5	
g.	20	70	150	„	„	„	5—10	„	„	„	5	„	„	„	5	—
-	40—60	150—200	250—300	„	„	„	15	„	„	„	20	„	„	„	15	—

Rohrzucker. Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

In geschützten Lösungen												Metall-speicherung
Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung												
Au_4				Collargol				Fulmargin				
. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
gekeimt	20—25	60—70	100—150	n. gekeimt	n. gekeimt	5	5—10	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	5	—
„	20	70—80	100—120	„	„	n. gekeimt	10—15	„	„	„	n. gekeimt	—
„	40	80	250	„	5—10	10—20	30—50	„	5—10	10—20	30—40	—

zucker. Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

5—20	50—70	150—200	300—350	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	n. gekeimt	5—10	—
0—15	60—70	150—180	300	„	„	„	5—15	„	„	„	10—15	—
—	—	—	—	„	10	15—20	50—80	„	„	10—20	50—80	—

nitratlösung 10:1. Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

schützten Lösungen									
Elektrocollargol				Metall-speicherung	Fulmargin				Metall-speicherung
Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung					Durchschnittliche Länge der Hyphen in μ an Tagen nach der Impfung				
. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.		n. 1 Tg.	n. 2 Tg.	n. 3 Tg.	n. 4 Tg.	
. gekeimt	n. gekeimt	5	5	—	n. gekeimt	n. gekeimt	10—15	10—15	—
„	„	5	5—10	—	„	„	20—25	25—30	—
—	—	—	—		—	—	—		

ösung 10:1. Temperatur 15—20° C. Metallgehalt 0,003%.

. gekeimt	n. gekeimt	10—15	10—15	—	n. gekeimt	n. gekeimt	10—15	10—15	—
„	„	20—25	100—150	—	„	„	20—25	100—150	
„	„	30—50	100	—	„	„	80	100—120	

Digitized by Google

abstirbt und seine Reservestoffe in das umgebende Medium austreten läßt. An einem Sporenkomplex machte ich die Beobachtung, daß ein Teil der jungen Hyphen bald abstarb, derart, daß ihr Plasma aus der Spitze der Mycelfäden sich in dem unteren Teil des Fadens zusammenzog. Durch seine starke Lichtbrechung und sein beständiges Schwinden verriet es, daß es sich nicht mehr in lebenskräftigem Zustande befand. Schließlich war es aus der Membran, die noch bestehen blieb, ganz verschwunden. Die anderen Hyphen desselben Komplexes entwickelten sich in der gleichen Zeit auffallend kräftig, und es hatte den Anschein, als ob das Nährsubstrat örtlich mit einer geringen Menge von Nährstoffen angereichert würde, die das bessere Vorwärtskommen der lebenden Hyphen ermöglichten.

Nicht sehr verschieden von der Entwicklung des Pilzes in sterilem Aq. dest. ist die in Einzellkulturen der reinen ungeschützten und geschützten Goldlösungen, wie aus Tabelle III hervorgeht. Das bemerkenswerteste Resultat, das aus ihr abzuleiten ist, zeigt sich darin, daß die vegetative Entwicklung in allen ungeschützten Goldlösungen sowohl als in der geschützten annähernd die gleiche ist. Das war angesichts des verschiedenen Dispersitätsgrades des Metalls in den Lösungen nicht ohne weiteres vorauszusehen In bezug auf die Anzahl der gekeimten Sporen ist zu bemerken, daß immer ein größerer Teil der als Einzellkulturen gezogenen Sporen in den Goldlösungen auskeimt als in sterilem Wasser, was wohl auf die geringen Mengen von Salzen in den Goldlösungen zurückzuführen ist. Die Erscheinung, daß eine größere Zahl von Sporen keimt, gegenüber denen in reinem Wasser, ist auch in einer Lösung von Au_{95} zu bemerken, in der aber die Goldteilchen ohne Zusatz eines Elektrolyten zu Boden gefallen waren. Die Entwicklung der Pilze in ihr verläuft in Ein- und Vielzellkulturen wie die in der entsprechenden intakten Goldlösung.

In den Stützkulturen in reinen Goldlösungen sind schon am 2. Tage nach der Impfung Querwände und kleine Verzweigungen ausgebildet. Die Hyphen sind länger und etwas breiter ($4-6\,\mu$) als in den Einzellkulturen. Das Gold übt also in allen Lösungen, in geschützten und ungeschützten, keine Wirkung in bezug auf die vegetative Entwicklung aus.

Die Metallspeicherung tritt bei allen ungeschützten Goldlösungen bei ein und demselben Pilz, nämlich bei Mucor muc., niemals ein, bei Aspergillus in Goldlösung ohne Zusatz nur selten und dann äußerst schwach nur in Vielzellkulturen, bei Penicillium dagegen regelmäßig in letzteren, und als Regel schon am 2. Tage nach der Impfung. In den geschützten Lösungen des Goldes, sowie in allen Silberlösungen, ist sie nie zu bemerken.

Dagegen geht aus Tabelle III aufs deutlichste die wachstumshemmende Natur der Silberlösungen hervor. Alles jedoch, was hierüber zu sagen ist, soll weiter hinten zusammenhängend kurz ausgeführt werden, und ich übergehe daher zunächst diese Erscheinungen.

Aus der Tabelle II geht weiter hervor, daß die vegetative Entwicklung der Organismen keine bemerkenswerten Unterschiede zeigt bei Zusatz von Würze oder Zucker zu den Stammlösungen. Daher unterließ ich, weil Au_8 und Au_{95} ohnehin den Würzezusatz nicht vertragen, eine vergleichende

Digitized by Google

Zusammenstellung der Kulturen in verdünnter Würzegoldlösung und gab in Tabelle IV eine Übersicht der Pilzentwicklung in den Kolloiden mit 2% Rohrzuckerzusatz. Da es sich gezeigt hatte, daß das Vorwärtskommen der Organismen in keiner der 4 verschieden dispersen Goldlösungen irgendeine Besonderheit erkennen ließ, war es nicht mehr nötig, die Entwicklung in allen 4 Goldsolen aufzuführen. Ebenso hatte es sich ergeben, daß ein Unterschied in der Wirkung der Silberlösungen weniger in den beiden auf elektrischem Wege hergestellten, als zwischen ihnen und dem auf chemische Weise reduzierten zu bemerken war. Es genügte daher, die Lösungen, die besonderes Interesse beanspruchten, hervorzuheben.

Es wurde der Zuckerzusatz zu dem grobteiligen Goldsol hauptsächlich gewählt, um den Eintritt und den Verlauf der Metallspeicherung in ihm zu beobachten, da in den Lösungen ohne Zusatz eines Nährsubstrates diese Reaktion immer weniger intensiv und unsicher eintrat. Dies hängt mit der Möglichkeit der Säurebildung in gezuckerten Lösungen zusammen, wie aus den späteren Ausführungen verständlich werden wird. Es zeigte sich bei Aspergillus am 4. Tage, bei Penicillium schon am 3. eine Färbung der Hyphen, und die Verfolgung der Reaktion in dieser Lösung gewährte manche Aufschlüsse über ihre Natur. Des weiteren geht aus Tabelle IV von neuem hervor, daß bei allen Kulturen in geschützten Lösungen die Speicherung des Metalls ausbleibt. In zuckerhaltigen Goldlösungen ist die Länge der Hyphen und die Keimungszeit der Sporen gleich denen in der wässerigen Zuckerlösung, wie durch Vergleich mit Tabelle II leicht festzustellen ist; sie ist eine viel bessere als im destillierten Wasser; im Vergleich mit den aus Tabelle II und Tabelle V ersichtlichen Resultaten aus der verdünnten wässerigen und goldhaltigen künstlichen Nährlösung immerhin noch eine recht kümmerliche. Der Unterschied in der Keimungszeit und der Hyphenlänge fällt sofort in die Augen; nach kurzer Zeit hat das Mycel eine Länge von mehr als einem Millimeter erreicht, Aspergillus und Penicillium erreichen dies Stadium meistens am 3. Tag, der schnellere Mucor schon am 2. nach der Impfung. In allen Kulturen der ungeschützten Goldlösung ist bei Aspergillus nig. und bei Penicillium A, sowohl bei einzeln gezogenen Sporen als auch bei denen, die zu mehreren im gleichen Substrat keimten, Metallspeicherung schon am 2. Tage eingetreten, und dies ist bei guten Ernährungsbedingungen für beide als das „Normale" zu bezeichnen. Andere Pilze der gleichen Art, wie z. B Pen. olivaceum, fangen schon früher mit der Speicherung an, sehr schnell beginnt auch Citromyces, wesentlich später dagegen zeigen Pen. glaucum und Aspergillus glaucus durch den ersten grauroten Farbton ihrer Hyphen eine Beeinflussung durch das Gold an; die übrigen Penicilliumarten, sowie Botrytis vulg. beginnen alle bei günstigen Kulturbedingungen im Laufe des 2. Tages mit der Einlagerung. Dagegen zeigt Mucor in keiner Kultur eine Verdichtung des Metalls. Seine Hyphen lassen in den schwach alkalischen ungeschützten Lösungen nicht den geringsten grauroten Schimmer erkennen. Ebenso verhalten sich Monilia var., Dematium pull., Oidium lact., sowie die Hefen und Bakterien. Über die Algen, die höheren Pflanzen und die niederen Tiere wird sofort berichtet werden.

Digitized by Google

In allen geschützten Lösungen ist bei den Kulturen sämtlicher Pilze während der in den Tabellen angegebenen Zeit und den angegebenen Lösungen nie Metallspeicherung zu bemerken. Über den dicht neben- und übereinanderliegenden Mycelfäden der Vielzellkulturen erscheint mehrere Tage später ein schwachroter, resp. gelber Farbton. Einzeln liegende Hyphen zeigen auch diese schwachen Tönungen, wenn überhaupt, erst viel später. Auf ihre Ursache wird später einzugehen sein[1]).

II. Das Verhalten der Algen, der höheren Pflanzen und der niederen Tiere in den Goldlösungen.

Bisher besprachen wir nur das Verhalten der verschiedensten Pilze in den schwach alkalischen ungeschützten und in den geschützten Lösungen des Goldes und stellten fest, daß einige dieser Organismen das Metall aus ungeschützten schwach alkalischen Goldsolen fixieren, während andere dazu nicht zu veranlassen sind. In geschützten Lösungen des Goldes und des Silbers trat unter den angegebenen Kulturbedingungen und während der in den Tabellen angegebenen Zeit nie Metallspeicherung ein.

Wir wenden uns jetzt anderen niederen Organismen zu, zunächst der Gruppe der Algen. Eine besonders dicke Schleimschicht lag um die eigentliche Zelle einer Protococcalesart; sie war oft 10—12 μ breit, während die eigentliche Alge einen Durchmesser von 25—30 μ hatte. Auch eine Nostocart war gänzlich eingebettet in voluminöse Gallertmassen. Farbstoffen gegenüber verhalten sich diese Schleimsubstanzen in spezifischer Weise, dem Golde gegenüber zeigten alle das gleiche Verhalten; es war auf keine Art möglich, weder in saurem noch in alkalischem Hydrosol eine Färbung auch nur der schwächsten Tönung zu erzielen. Das saure Hydrosol wurde durch Zusatz von Oxalsäure wie beschrieben hergestellt, und es gelang aus später zu erläuternden Gründen in manchen Fällen, in ihm eine Metallspeicherung zu erzielen, bei Organismen, die in schwach alkalischen Lösungen nicht fixierten. Die Einwirkung der geringen Säuremengen überdauerten diese zarten Organismen nicht lebend, aber nie war, weder bei lebenden noch bei abgestorbenen, Beeinflussung durch das Gold zu erkennen. Ebenso verhielten sich die Diatomeen.

Besondere Mühe gab ich mir mit einer aus dem hiesigen botanischen Institut erhaltenen Zygnema. Es ist eine Art, bei der die Kopulation leiterförmig erfolgt und die runden Sporen in den nicht verdickten Zellen des einen Fadens liegen. Die Zellen sind 2—$2^1/_2$ mal so lang als breit, ihre Breite beträgt 23—27 μ. Von Pfeffer[2]) ist ein Verfahren angegeben worden, nach dem schon während des Lebens die Wandung der Zellen einiger Algen Anilinfarben und andere Farbstoffe speichern, ohne daß die Organismen getötet werden. Klebs[3]) wandte diese Methode bei Zygnema an und erwies dadurch, daß diese eine kurze Einwirkung schwacher Säure

[1]) Siehe S. 35.

[2]) Pfeffer, Untersgen. aus d. bot. Inst. z. Tübingen. Bd. II. 1886. S. 277.

[3]) Klebs, Untersgen. aus d. bot. Inst. z. Tübingen. Bd. II. 1886.

Digitized by Google

lebend übersteht. Ich brachte daher meine Zygnema während 1—2 Min. in die Goldlösung mit 0,045% Oxalsäuregehalt, zog sie dann einen Augenblick durch frisches Wasser und wiederholte diesen Prozeß bis zu 10 Malen. Dann wurde die Alge in schwach alkalische Goldlösung gelegt. Es gelang aber nicht, Goldspeicherung hervorzurufen.

Es bleibt mir die Beschreibung der Versuche mit höheren Pflanzen. Die Getreidekörner wurden angekeimt in porösen Tongefäßen, in denen sich feuchtes Fließpapier befand, und durch die Wandung der Gefäße hindurch stets mit Feuchtigkeit versehen. Bei dieser Methode des Keimens bilden sich die zarten Wurzelhärchen in besonders reicher Weise aus, und es war zu erwarten, daß, wenn überhaupt, an ihnen das Gold fixiert werden würde. Ein Teil der Würzelchen wurde in die alkalische, ein anderer in die saure Goldlösung gebracht. Es fand nirgends Speicherung statt. Eine weitere Partie der gerade gekeimten Körner wurde in die Sachssche Nährlösung übertragen. Diese reagiert in unbewachsenem Zustande schwach alkalisch. Von den benutzten Arten zeichnen sich Roggen und Hafer durch starke Säureausscheidung, Weizen und Gerste dagegen durch schwache Säurebildung aus. Aber auch als die Würzelchen 5—7 cm und die Sprosse 10—12 cm lang waren, war die Nährlösung der Roggen- und Haferkeimlinge noch gar nicht angesäuert. Wurden diese dann mit der Region der Haare längere Zeit auf feuchtes blaues Lackmuspapier gelegt, so zeigte es schwache Rötung. Bei Weizen- und Gerstekeimlingen versagte auch diese Methode, eine Säureausscheidung nachzuweisen. Als alle Würzelchen dann in Goldlösung mit einem Gehalt von 0,045% Oxalsäure eingelegt wurden, schlug diese sofort in Blau um. Vielleicht war dies, besonders bei Roggen- und Haferpflänzchen mit nachweisbarer schwacher Säurebildung, die Wirkung der Säure, wahrscheinlich war es aber der Einfluß kleiner Proteidteilchen, die sich von den Wurzelhaaren ablösten, und deren Wirkung später erklärt werden soll[1]). Jedenfalls fand in keiner Lösung gleichmäßige Speicherung statt. Außer den Würzelchen wurden Teile aus der Spitzenregion der Sprosse in Goldhydrosol eingelegt. Nur in einem Falle sah ich in Au_4 (schwach alkalisch) eine ziemlich regelmäßige Speicherung an einer Schnittfläche um ein Gefäß herum, in einer Entfernung von $^1/_2$ cm von der Spitze. In einer Ausdehnung von 72 μ waren von der Fläche aus in die Scheide hinein die Tracheen deutlich gleichmäßig gefärbt. Nachdem die Würzelchen und die Scheiden durch Kochen abgetötet waren, wurde ebenfalls nie, weder in saurer noch in alkalischer Lösung, eine Färbung beobachtet.

In einem Heuaufguß war eine kleine Art von Amöben (Amoeba limax?) gewachsen. Die Tiere wurden nach der von Kükenthal[2]) angegebenen Methode von Beimengungen befreit und mit der Goldlösung zusammengebracht. Auch nach 24stündiger Einwirkung war keinerlei Beeinflussung durch das Gold an ihnen wahrzunehmen.

Die ebenfalls im Heuaufguß auftretenden Colpidien lagerten nie ein.

---

[1]) Vgl. S. 50.

[2]) Kükenthal. Zool. Praktikum. Jena. 1905.

Digitized by Google

Anders verhielt sich eine kleine Art von Paramäcien aus dem gleichen Substrat. Die Tiere sind 50—60 μ groß, sehr lebhaft beweglich, mit einer contractilen Vakuole. Sie werden aus dem Heudekokt direkt in die schwach alkalische ungeschützte Goldlösung übertragen. Am 2. Tage danach waren immer noch einige Tiere mehr oder weniger lebhaft schwimmend aufzufinden. Diese Tiere zeigen eine große Menge blauschwarzer Flecken von Gold, die im ganzen Plasma liegen. Dieses selbst hat sich nicht gefärbt, und auf der Pellicula ist keine Veränderung bemerkbar. Die Goldanhäufungen liegen in dem Körper der Tiere, das Gold muß also bei der Nahrungsaufnahme in die Paramäcien hineingekommen sein. Nach Hertwig[1]) geht diese so vor sich, daß am Grunde des Cytopharynx an einer nicht von der Pellicula überzogenen Stelle Wasser und Körperplasma miteinander in Berührung kommen. Durch das Schlagen der Cilien wird Wasser und darin enthaltene Nahrung gegen das Plasma gedrückt; dieses gibt dem Druck nach, die entstehende Ausstülpung schnürt sich ab, es ist eine Flüssigkeitsansammlung, eine Nahrungsvakuole, entstanden. In dieser zeigt sich nach kurzer Zeit (Tab. VII) schwache, graurote Färbung, die nach und nach intensiv rot wird und schließlich in Blaurot übergeht. Während in normalem Zustande die Nahrungsvakuolen nie in besonders großer Zahl im Körper liegen, häufen sie sich nach der Goldaufnahme immer mehr an, die beschriebene blauschwarze Farbe zeigend. — Um festzustellen, ob durch äußere Einflüsse die Anhäufung des Goldes in den Tieren geändert werden könnte, wurden sie in verschieden starken Kochsalzlösungen mit Gold zusammengebracht. Coehn und Barrat[2]) lehrten nämlich, daß in verschieden konzentrierten Salzlösungen diese Tiere eine ungleiche elektrische Ladung tragen. Bei einer Kochsalzkonzentration der Umgebungsflüssigkeit von 0,058% waren die von ihnen untersuchten Paramäcien positiv, in einer Lösung von 0,58% Kochsalzgehalt waren sie negativ geladen. Die Möglichkeit einer solchen Umladung der Tiere beruht auf der Annahme, daß die Zellhaut ungleiche Durchlässigkeit für positive und negative Ionen aufweist, indem die negativen Ionen sie passieren, die positiven aber zurückgehalten werden. In die verdünnte Kochsalzlösung (0,058%) diffundieren negative Ionen aus dem Tier hinein, dieses selbst bleibt positiv geladen zurück; in konzentrierteren Lösungen diffundieren aus der Umgebung negative Ionen in das Tier hinein, das eine negative Ladung annimmt. Coehn und Barrat erklären hiermit den Richtungswechsel im Galvanotropismus der Paramäcien. In meinem Fall war es anzunehmen, daß das ungleich geladene Tier sich den stets negativ geladenen Goldteilchen gegenüber verschieden verhalten würde. Die von mir untersuchte Art vertrug einen Kochsalzgehalt von 0,1 n = 0,58% sehr schlecht (Tab. VI). Nach kurzer Zeit treten an den Tieren Bewegungsänderungen und seitliche Zusammenpressungen auf, das Plasma wird körnelig, der Kern wird sichtbar. Nach $1^1/_2$ Stunden sind alle Tiere unbeweglich, bei einigen ist die Membran geplatzt und Plasma ausgetreten. Eine Goldanhäufung ist nicht bemerkbar

[1]) Hertwig, Lehrb. d. Zoolg. Jena. 1905.

[2]) Coehn u. Barrat, Zeitschr. f. allg. Physiol. 5, 1905.

Digitized by Google

Tabelle VI.

Paramaecien. Tag der Beobachtung: 29. 10. 1919. Goldsol: Au_4.

Zeit der Beobachtung	Speicherung auf der Pellicula in Lösungen ohne Zusatz	Speicherung im Innern in Au_4 ohne Zusatz	Speicherung im Innern in Au_{20} ohne Zusatz	Speicherung auf der Pellicula in Lösungen mit Zusatz	Speicherung im Innern in 0,058 proz. NaCl—Au_4-Lösung	Speicherung im Innern in 0,145 proz. NaCl—Au_4Lösung	Speicherung im Innern in 0,29 proz. NaCl—Au_4-Lösung	Speicherung im Innern in 0,58 proz. NaCl—Au_4-Lösung
10^h 15′				—				—
10^h 30′	—	+	+	—	—	—	—	—
10^h 45′	—			—	+	—	—	—
11	—			—		—	—	—
11^h 15′	—			—		—	—	—
11^h 30′	—			—		+	—	Par. tot, nirgends Speicherung
11^h 45′	—			—			+	

In der schwachen Kochsalzlösung von 0,05 n = 0,29%, die von den Tieren gut ertragen wird, zeigen sich die ersten Spuren der Metallaufnahme bei einigen Tieren nach $1^1/_2$ Stunden, also wesentlich später als in Goldlösung ohne Zusatz oder mit noch schwächerem Kochsalzzusatz. Es wurde außerdem noch ein schwacher, nur in dieser Menge von dem Goldsol ertragener Zusatz von $MgSO_4$ (Tab. VII) gemacht, bei dem die Goldaufnahme nicht verzögert wird. Wesentlich hinausgeschoben wird sie jedoch durch einen Zusatz von K_2CO_3 in höherer Konzentration, und zwar um so länger, je konzentrierter die Lösung ist. Die Tiere zeigen auch in der starken Alkalilösung keine Unregelmäßigkeiten in Gestalt und Bewegung.

Es scheint also, als ob durch den Zusatz von Salzen in der ersten Zeit der Einwirkung wohl Veränderungen in bezug auf die Goldeinlagerung im Körper der Tiere hervorgerufen würden, als ob diese aber die Fähigkeit

Tabelle VII.

Paramaecien. Tag der Beobachtung: 1. 11. 19. Goldsol: Au_4.

Beobachtungszeit	Speicherung auf der Pellicula	Speicherung in 0,012 proz. $MgSO_4$-Lsg.	Speicherung in 0,188 proz. K_2CO_3-Lsg.	Speicherung in 0,69 proz. K_2CO_3-Lsg.	Speicherung in 1,88 proz. K_2CO_3-Lsg.
10^h Anfang					
10^h 15′	—	+	—	—	—
10^h 30′	—		—	—	—
10^h 45′	—		—	—	—
11^h	—		—	—	—
11^h 15′	—		—	—	—
11^h 30′	—		—	—	—
11^h 45′	—		—	—	—
12^h	—		+	—	—
1^h	—			—	—
2^h 30′	—				—

Digitized by Google

Anders verhielt sich eine kleine Art von Paramäcien aus dem gleichen Substrat. Die Tiere sind 50—60 μ groß, sehr lebhaft beweglich, mit einer contractilen Vakuole. Sie werden aus dem Heudekokt direkt in die schwach alkalische ungeschützte Goldlösung übertragen. Am 2. Tage danach waren immer noch einige Tiere mehr oder weniger lebhaft schwimmend aufzufinden. Diese Tiere zeigen eine große Menge blauschwarzer Flecken von Gold, die im ganzen Plasma liegen. Dieses selbst hat sich nicht gefärbt, und auf der Pellicula ist keine Veränderung bemerkbar. Die Goldanhäufungen liegen in dem Körper der Tiere, das Gold muß also bei der Nahrungsaufnahme in die Paramäcien hineingekommen sein. Nach Hertwig[1]) geht diese so vor sich, daß am Grunde des Cytopharynx an einer nicht von der Pellicula überzogenen Stelle Wasser und Körperplasma miteinander in Berührung kommen. Durch das Schlagen der Cilien wird Wasser und darin enthaltene Nahrung gegen das Plasma gedrückt; dieses gibt dem Druck nach, die entstehende Ausstülpung schnürt sich ab, es ist eine Flüssigkeitsansammlung, eine Nahrungsvakuole, entstanden. In dieser zeigt sich nach kurzer Zeit (Tab. VII) schwache, graurote Färbung, die nach und nach intensiv rot wird und schließlich in Blaurot übergeht. Während in normalem Zustande die Nahrungsvakuolen nie in besonders großer Zahl im Körper liegen, häufen sie sich nach der Goldaufnahme immer mehr an, die beschriebene blauschwarze Farbe zeigend. — Um festzustellen, ob durch äußere Einflüsse die Anhäufung des Goldes in den Tieren geändert werden könnte, wurden sie in verschieden starken Kochsalzlösungen mit Gold zusammengebracht. Coehn und Barrat[2]) lehrten nämlich, daß in verschieden konzentrierten Salzlösungen diese Tiere eine ungleiche elektrische Ladung tragen. Bei einer Kochsalzkonzentration der Umgebungsflüssigkeit von 0,058% waren die von ihnen untersuchten Paramäcien positiv, in einer Lösung von 0,58% Kochsalzgehalt waren sie negativ geladen. Die Möglichkeit einer solchen Umladung der Tiere beruht auf der Annahme, daß die Zellhaut ungleiche Durchlässigkeit für positive und negative Ionen aufweist, indem die negativen Ionen sie passieren, die positiven aber zurückgehalten werden. In die verdünnte Kochsalzlösung (0,058%) diffundieren negative Ionen aus dem Tier hinein, dieses selbst bleibt positiv geladen zurück; in konzentrierteren Lösungen diffundieren aus der Umgebung negative Ionen in das Tier hinein, das eine negative Ladung annimmt. Coehn und Barrat erklären hiermit den Richtungswechsel im Galvanotropismus der Paramäcien. In meinem Fall war es anzunehmen, daß das ungleich geladene Tier sich den stets negativ geladenen Goldteilchen gegenüber verschieden verhalten würde. Die von mir untersuchte Art vertrug einen Kochsalzgehalt von 0,1 n = 0,58% sehr schlecht (Tab. VI). Nach kurzer Zeit treten an den Tieren Bewegungsänderungen und seitliche Zusammenpressungen auf, das Plasma wird körnelig, der Kern wird sichtbar. Nach $1^1/_2$ Stunden sind alle Tiere unbeweglich, bei einigen ist die Membran geplatzt und Plasma ausgetreten. Eine Goldanhäufung ist nicht bemerkbar

[1]) Hertwig, Lehrb. d. Zoolg. Jena. 1905.

[2]) Coehn u. Barrat, Zeitschr. f. allg. Physiol. 5, 1905.

Digitized by Google

Tabelle VI.

Paramaecien. Tag der Beobachtung: 29. 10. 1919. Goldsol: Au_4.

Zeit der Beobachtung	Speicherung auf der Pellicula in Lösungen ohne Zusatz	Speicherung im Innern in Au_4 ohne Zusatz	Speicherung im Innern in Au_{20} ohne Zusatz	Speicherung auf der Pellicula in Lösungen mit Zusatz	Speicherung im Innern in 0,068 proz. NaCl—Au_4-Lösung	Speicherung im Innern in 0,145 proz. NaCl—Au_4Lösung	Speicherung im Innern in 0,29 proz. NaCl—Au_4-Lösung	Speicherung im Innern in 0,58 proz. NaCl—Au_4-Lösung
10^h 15′				—				—
10^h 30′	—	+	+	—	—	—	—	—
10^h 45′	—			—	+	—	—	—
11	—			—		—	—	—
11^h 15′	—			—		—	—	—
11^h 30′	—			—		+	—	Par. tot, nirgends Speicherung
11^h 45′	—			—			+	

In der schwachen Kochsalzlösung von 0,05 n = 0,29%, die von den Tieren gut ertragen wird, zeigen sich die ersten Spuren der Metallaufnahme bei einigen Tieren nach $1^1/_2$ Stunden, also wesentlich später als in Goldlösung ohne Zusatz oder mit noch schwächerem Kochsalzzusatz. Es wurde außerdem noch ein schwacher, nur in dieser Menge von dem Goldsol ertragener Zusatz von $MgSO_4$ (Tab. VII) gemacht, bei dem die Goldaufnahme nicht verzögert wird. Wesentlich hinausgeschoben wird sie jedoch durch einen Zusatz von K_2CO_3 in höherer Konzentration, und zwar um so länger, je konzentrierter die Lösung ist. Die Tiere zeigen auch in der starken Alkalilösung keine Unregelmäßigkeiten in Gestalt und Bewegung.

Es scheint also, als ob durch den Zusatz von Salzen in der ersten Zeit der Einwirkung wohl Veränderungen in bezug auf die Goldeinlagerung im Körper der Tiere hervorgerufen würden, als ob diese aber die Fähigkeit

Tabelle VII.

Paramaecien. Tag der Beobachtung: 1. 11. 19. Goldsol: Au_4.

Beobachtungszeit	Speicherung auf der Pellicula	Speicherung in 0,012 proz. $MgSO_4$-Lsg.	Speicherung in 0,138 proz. K_2CO_3-Lsg.	Speicherung in 0,69 proz. K_2CO_3-Lsg.	Speicherung in 1,38 proz. K_2CO_3-Lsg.
10^h Anfang					
10^h 15′	—	+	—	—	—
10^h 30′	—		—	—	—
10^h 45′	—		—	—	—
11^h	—		—	—	—
11^h 15′	—		—	—	—
11^h 30′	—		—	—	—
11^h 45′	—		—	—	—
12^h	—		+	—	—
1^h	—			—	—
2^h 30′	—				—

Digitized by Google

hätten, sich nach und nach an die Chemikalien anzupassen und dann wieder in normaler Weise zu reagieren. In diesem Zusammenhange möchte ich auf die Untersuchung von Bankroft[1]) hinweisen, aus der hervorgeht, daß in Lösungen mit Salzzusätzen, die zunächst eine Umkehr der Schwimmrichtung hervorriefen, auch der Galvanotropismus nach und nach wieder kathodisch wird.

Das Endstadium in Lösungen mit Salzzusätzen war das gleiche wie in Lösungen ohne diese: die Tiere zeigen eine große Anhäufung von Vakuolen, die alle eine blauviolette Färbung besitzen.

Charakterisierung der Goldspeicherung.

Im folgenden sei eine Charakterisierung der Goldspeicherung sowie der sie begleitenden morphologischen und physiologischen Einwirkungen, am Aspergillus-niger-Mycel in Vielzellkulturen und ungeschützten, aber mit Nährstoffen angereicherten Lösungen von Au_4 oder Au_{40} gegeben. Bei Penicillium und den anderen speichernden Organismen spielen sich diese Vorgänge genau so ab, es genügt daher, die Verhältnisse am Aspergillusmycel zu beschreiben und nur etwaige für andere Spezies in Betracht konmenden Abweichungen zu erwähnen.

Einen Tag nach der Impfung liegt ein Teil der Aspergillussporen gequollen, aber in der Farbe unverändert, in der Lösung, ein anderer Teil hat sich bei günstigen Temperaturbedingungen (Optimaltemperatur 36°) schon schwach gefärbt. Am 2. Tag erscheint ein großer Teil der Sporen dunkelrot von eingelagertem Golde. Eine große Zahl der Sporen ist gekeimt. Der ganz junge Keimschlauch ist ungefärbt. Ist an ihm schon eine Verfärbung bemerkbar, so ist sie von graurötlicher, später rosa Tönung, heller als die Spore. Erst wenn ein gewisses Alter erreicht ist, wird die Färbung intensiver und dringt weiter im Mycelfaden vor. Die Einlagerung geht also von der Spore aus und setzt sich bis in das Hyphenende fort, derart, daß dieses zuerst immer am schwächsten gefärbt ist. Zunächst tingiert sich die Haupthyphe, erst nach und nach geht die Einlagerung auch in die Seitenzweige über. Hierbei hört die Färbung oft an einer Querwand unvermittelt auf, so daß dann das obere Ende der Hyphe gänzlich ungefärbt erscheint. Es kommt jedoch auch eine sanftere Abtönung der Hyphe vor. Die in gewöhnlichen Nährsubstraten bekanntlich vollständig farblosen Mycelfäden nehmen also aus den in der dünnen Schicht unter dem Mikroskop absolut durchsichtigen, wasserhellen Goldsolen alle verfügbaren Goldteilchen auf, so daß sie allmählich tief dunkelrot werden und dieselbe Farbe annehmen, die die Goldlösung in dicker Schicht zeigt. Verdichtet sich das Gold auf oder in den Hyphen noch mehr, so nehmen diese schließlich einen tief blauroten bis schwärzlichen Farbton an. Diese Farbenänderung erklärt

[1]) Bankroft, Arch. f. Physiol. 107. 1905.

Digitized by Google

sich aus dem verschiedenen Abstande der Goldteilchen. Je näher die Teilchen aneinander liegen, desto dunkler ist die Farbe.

Mit der Einlagerung tritt eine wesentliche Verdickung des „infizierten" Materials ein. Sporen von 12—15 μ Durchmesser und Hyphen von einer Breite von 10 μ am Sporenaustritt sind keine Seltenheit, während die gequollene, aber nicht infizierte Spore einen Durchmesser von 10 μ selten überschreitet, und das nicht infizierte Mycel eine Breite von 4—8 μ besitzt. Diese Verbreiterung läßt sich oft an Seitenzweigen sehr schön beobachten, wo sie genau so weit geht, wie die Färbung des Mycels.

Eine Veränderung der Membrankontur oder Veränderungen in der Umgebung der Membran sind unter normalen Bedingungen nicht festzustellen. Die gefärbte Zone schließt genau mit der Membranbegrenzung ab. Die Speicherung geht oft bis zur scheinbaren Erschöpfung des Goldvorrats; wird neue Lösung hinzugefügt, so vertieft sich die Farbe der infizierten Hyphen, oder es nehmen die noch nicht infizierten die Goldteilchen auf. Am Ende des Speicherungsvorganges ist kein Unterschied im Farbton zwischen Sporen und Hyphenspitzen zu erkennen. Die Hyphen erscheinen ganz gleichmäßig rot bzw. blaurot, nirgends sind Unregelmäßigkeiten, Koagulationshäufchen, nicht infizierte Stellen oder dergleichen wahrzunehmen. Die Lösungen Au_4 und Au_{40} koagulierten nie, auch nicht, nachdem die Pilze lange Zeit in ihnen gewachsen waren.

Betont soll noch einmal werden, daß die Sporen sich stets, und zuerst vor den Hyphen färbten, allerdings mit der Einschränkung, daß nur die keimenden Sporen die Goldteilchen aufnahmen, nie die, welche ungekeimt in der Flüssigkeit lagen. Williams erwähnt nämlich in der schon genannten Arbeit, daß die Sporen nicht aufnehmen, und führt das auf die Cuticularisierung der Sporenmembran zurück. Es ist dies darin begründet, daß die Speicherung immer erst dann eintritt, wenn gewisse noch ausführlich zu besprechende Äußerungen des Lebens im Organismus eingesetzt haben.

Um den Unterschied in der Speicherung zwischen lebenden und toten Hyphen festzustellen, wurde gut einlagerndes Aspergillusmycel, das in goldfreier Lösung gezogen war, auf verschiedene Weise abgetötet. Aus Tabelle VIII ist zu ersehen, welche Reagenzien hierzu verwendet wurden und

Tabelle VIII.

Abgetötetes Mycel von Aspergillus niger.

Abtötungsmittel	Dauer der Abtötung	Auswaschen in Aq. dest.	Speicherung in Au schw. alkalisch	Speicherung in Au schw. sauer
Kochen	5 Min.	—	Unregelmässige schwache Färbung in wenigen Hyphen	Schwache Färbung in einig. Hyphen
50 proz. Alkohol	10—20 Min.	$^1/_2$ Stunde	,,	,,
1 proz. H_2SO_4	10—20 ,,	$^1/_2$,,	,,	,,
30 proz. CH_3COOH	10—20 ,,	$^1/_2$,,	,,	,,
5 proz. Formalin	10—20 ,,	$^1/_2$,,	,,	,,

Digitized by Google

wie lange sie einwirkten. Nach dem Abtöten wird das Mycel in Goldlösung eingelegt. Das Auswaschen in Wasser war nötig, weil sonst am Mycel haftengebliebene Säurereste das Gold zum Ausfallen brachten und dann keine Einlagerung mehr eintreten konnte. Nach $^1/_2$ Stunde andauerndem Auswaschen koagulierte die Goldlösung nach Einlegen des Mycels nie mehr. In der schwach sauren und schwach alkalischen ungeschützten Goldlösung ist das Resultat das gleiche: in einigen Hyphen ist eine schwache, graurötliche Färbung wahrzunehmen, die sich nicht vertieft. Eine gleichmäßige, nach und nach sich vertiefende Färbung wurde nie beobachtet. Hierin stimme ich mit Williams überein, die ausdrücklich bemerkt, daß die Speicherung im toten Material weniger reichlich und gleichmäßig sei.

Die Goldspeicherung verläuft bei Au_8 in der beschriebenen Weise. Das war vorauszusehen, denn die Lösungen stehen einander in der Teilchengröße nahe und stimmen in der Konzentration genau überein. Au_8 ist jedoch sehr instabil. Am 3. Tage sind Sporen und Mycelschläuche gefärbt. Die Lösung in der Umgebung der Hyphen ist intakt. Am 4. Tage jedoch liegen um die Hyphen herum, oft im Umkreise von mehreren μ kleine schwarze Agglomerate von koaguliertem Gold. Die Infizierung der Hyphen geht dann nicht weiter.

Weniger leicht erfolgt die Einlagerung des Metalls in dem grob dispersen Sol Au_{95}. In den Einzellkulturen gelang sie nie, in den Vielzellkulturen nicht immer. Auffällig war die geringe Verdickung der in dieser Lösung gefärbten Hyphen. Am 3. Tag war die Fixierung des Goldes deutlich bemerkbar, in der Lösung war keine Koagulation festzustellen. Am 4. Tage war auch hier, wie in dem auf die gleiche Weise hergestellten Au_8, das Gold ausgefällt, die Speicherung ging dann nicht weiter.

Hervorgehoben muß besonders für Penicillium noch die Tatsache werden, daß in parallelen Einzellkulturen unter sonst gleichen Bedingungen, von denen der eine Teil aber das Metall in dem Nährsubstrat nicht enthielt, niemals die Fruktifikation gleichzeitig auftrat. Während in den Einzellkulturen mit sterilem Wasser und Würze im Verhältnis 20: 1 die Fruktifikation am 5. Tage nach der Impfung fast sicher, meistens schon früher, eingetreten war, hatten die Einzellkulturen in Goldlösung und Würze im Verhältnis 20: 1 zu der Zeit nie fruktifiziert. Viele Kulturen kamen überhaupt nicht zur Conidienabschnürung, wenn sie aber eintrat, so geschah es erst mehrere Tage später als in den Parallelkulturen ohne Gold. Die Form und Größe der Sporen ist dann normal. Dieselbe Verzögerung der Sporenentwicklung wurde auch in Vielzellkulturen beobachtet. Dasselbe gilt für Aspergillus niger.

Der in den Goldlösungen spontan auftretende Pilz dürfte stets ein Penicillium sein. Ich isolierte im Laufe der Untersuchungen eine große Zahl von Individuen aus verschiedenen Hydrosolen, es waren stets Penicilliumarten.

Nach den eben gemachten Ausführungen liegt die Frage nahe, welche Teile des Hyphe infiziert werden, mit anderen Worten, wo die Einlagerung stattfindet. Von vorneherein war es nicht

Digitized by Google

sehr wahrscheinlich, daß die Goldteilchen die Plasmahaut durchdringen, und sich im Plasma einlagern könnten. Ist zwar die älteste[1]), so oft verworfene[2]) Permeabilitätshypothese von Traube, nach der die Möglichkeit des Durchtritts durch die Plasmahaut abhängen sollte von ihren intermycellaren Zwischenräumen und den Molekülgrößen der eindringenden Substanzen, in neuerer Zeit zu neuem Leben erweckt[3]), so erklärt sie doch bei weitem nicht die zahlreichen Permeabilitätsunterschiede bei den Zellen. Dieser Forderung werden die Vertreter der von Overton begründeten und nach ihm von verschiedenen Forschern erweiterten Lipoidtheorie, die in der Plasmahaut ein Mosaik von lipoidlöslichem und protoplasmatischem, eiweißreichem Material sehen, durch das nur die Stoffe eindringen, die sich in dieser Plasmahaut lösen, weit mehr gerecht. Danach war es unmöglich, daß Metallteilchen, und seien sie auch noch so klein, durch die Plasmahaut in die Zelle selbst eindringen können. Dennoch wurden verschiedene Untersuchungen angestellt, um Klarheit über diesen Punkt zu bekommen.

Zunächst versuchte ich, die Hyphen zu plasmolysieren. Gelang es, Plasmolyse hervorzurufen, so konnte aus der Färbung des zusammengeballten Plasmas, die durch die Membran hindurch erkenntlich war, auf seine Goldaufnahme geschlossen werden. Mit konzentrierter Kochsalzlösung gelang die Plasmolyse bei jungen Hyphen und Sporen gut, bei alten nur an der Spitze und unvollkommen. Das Plasma zeigte sich als gar nicht gefärbt. Sein Farbton ist heller als der der Membran.

Auf dem gleichen Prinzip, nämlich auf dem Hervortreten eines verschiedenen Farbtons des zusammengeballten Plasmas und der entleerten Membran, beruhte eine Reihe von Versuchen mit Plasmaverdauung. Hierzu wurde Pepsinglycerin in saurer Lösung den Hyphen zugesetzt. Hierdurch wurde zunächst Plasmolyse hervorgerufen. Das Glycerin dringt, als wenig lipoidlöslicher Stoff nur langsam durch die Plasmahaut ins Innere der Zelle ein. Nach etwa einer Stunde aber war die Plasmolyse verschwunden, und die Plasmaverdauung setzte ein. Bald waren

[1]) Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. 1904. — Arch. f. d. ges. Physiol. 1913, S. 153.

[2]) Tammann, Zeitschr. f. physikal. Chemie 1892.

[3]) Bechold, Zeitschr. f. physikal. Chemie 60. 1907.

Digitized by Google

in der Hyphe kleine, einzeln liegende Plasmaklümpchen zu erkennen. Sie schimmerten hell durch die Membran hindurch.

Das gleiche gilt von einem Versuch mit Gelatine lösendem Bakterienferment, das allerdings viel langsamer wirkte.

Bei den durch Chloralhydrat hervorgerufenen (100 g Chloralhydrat, 400 g H_2O) Quellungserscheinungen des Plasmas sah man dieses ebenfalls hell durch die Membran hindurchschimmern.

Hiernach war es als sicher anzusehen, daß die Goldteilchen nur in die Membran, nicht aber in das Plasma eindringen, und als ich dieses durch die Arbeit von Williams, die mir erst später bekannt wurde, bestätigt fand, in der die Verfasserin mitteilt, daß sie an Paraffinschnitten durch das Mycel keine Einlagerung im Plasma, sondern nur gleichmäßige Färbung der Membran wahrnehmen konnte, unterließ ich weitere auf diese Frage bezüglichen Untersuchungen. Es ist aber die Membran in ihrer ganzen Breite und nicht nur auf ihrer Oberfläche von Gold durchsetzt.

Hiermit fällt auch der vielleicht naheliegende Gedanke, daß die Goldteilchen auf der Oberfläche der Membran durch deren Unebenheiten einfach mechanisch „festgehalten" sein könnten. Auch eine Anreicherung von Teilchen wäre dann einigermaßen zu erklären aus den diesen innewohnenden Kohäsionskräften, die bei den durch das Festhalten einiger Teilchen geschaffenen ungleichen Abständen des dispergierten Goldes größer sein würden als die durch die elektrische Ladung herbeigeführten Kräfte der Abstoßung. So käme es dann auf den Membranen zu einer Art Flockenbildung, einer Auflagerung, die sich aber durch mechanische Hilfsmittel, z. B. Waschungen, Ausflocken des Goldes usw. leicht beseitigen lassen müßte. Das ist nicht der Fall. Wiederholte Waschungen mit Aq. dest., tagelanges Liegen in Wasser oder verdünntem Alkohol, Behandlung mit Xylol oder Äther vermag die Färbung der Hyphen nicht zu beseitigen, nicht einmal zu schwächen. Auch die Versuche, das Gold auf den Hyphen zum Koagulieren zu bringen, mißlangen. Beim Zusatz von Elektrolyten sieht man unter dem Mikroskop bald kleine dunkle Koagulationshäufchen an den unbewachsenen Stellen des Präparates erscheinen, die infizierten Membranen jedoch bleiben unverändert. Die einzige Veränderung nach längerer Einwirkung der Elektrolyte liegt in einem Farbumschlag von Rot in Rotviolett

Digitized by Google

auf den infizierten Hyphen. Auch mit organischen Reagenzien versuchte ich es, auf die Membran einzuwirken. Es ist bekannt, daß einige Anilinfarbstoffe, z. B. Fuchsin und Methylenblau das Gold aus seinen kolloidalen Lösungen oft fast quantitativ ausfällen. Ich legte daher die infizierten Hyphen in eine Lösung dieser Stoffe. Auch mit den stärksten Vergrößerungen konnte keine Koagulation des Goldes auf dem Mycel wahrgenommen werden, vielmehr war das Gold gleichmäßig haftengeblieben. Beide Farbstoffe hatten gar nicht eingewirkt.

Es konnte also kein Zweifel darüber bestehen, daß das Gold fest mit der Membran verbunden war. Nun handelte es sich darum, festzustellen, ob es vielleicht mit den Membransubstanzen eine wirkliche Verbindung im chemischen Sinne eingegangen war, oder ob es seine Natur als elementares Gold behalten hatte. Im ersten Falle durfte es die Reaktionen, die typisch sind für kolloidal gelöstes Gold nicht mehr eingehen. Zwei der wenigen, rein chemischen Reaktionen des kolloidalen Metalls sind die Auflösung des Goldes in Chlorwasser und seine Auslaugung in Cyankali Bei der letzten Reaktion tritt erst Blaufärbung und dann Aufhellung der Flüssigkeit, die die Goldteilchen enthält, ein. Ich brachte also stark infizierte Hyphen von Aspergillus niger in Chlorwasser von 0,25% Chlorgehalt. Schon nach ganz kurzer Zeit trat Entfärbung des Mycels ein. Nach etwa 10 Minuten war die ganze Flocke entfärbt, ohne irgendwie deformiert zu sein. Erwärmte ich gelinde, so ging die Entfärbung noch schneller. Nicht ganz so schnell wirkte 5 proz. Cyankalilösung. Wurde sie kalt zugesetzt, so waren nach 2—3 Stunden alle einzeln liegenden Hyphen entfärbt. Wird jedoch das Mycel ohne Deckglas gelinde erwärmt, so geht auch hier die Entfärbung viel schneller; schon nach 5 Minuten ist die rote Farbe verschwunden. Wird die Cyankalilösung heiß zugesetzt, so wirkt sie ebenfalls bedeutend schneller als die kalte. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der elementare Zustand des Goldes bei der Speicherung erhalten geblieben ist.

Die bisherigen Versuche waren alle mit den Lösungen vorgenommen, in denen das Gold in einer Konzentration von 0,003% enthalten war. Um festzustellen, ob die Konzentration der Goldlösung einen Einfluß auf die Speicherung ausübt, wurde eine abgemessene Menge von Au_4 bis auf die Hälfte auf dem Wasser-

Digitized by Google

bad eingekocht und dann im Dialysator soweit konzentriert, bis die Restflüssigkeit auf den dritten Teil des Ausgangsvolums vermindert war. Die Lösung stellte nun eine tief dunkelrote, aber im auf- und durchfallenden Lichte durchaus klare, unter dem Mikroskop in dünner Schicht farblose und homogene Flüssigkeit dar. Als Vergleichsflüssigkeit wurde außer der gewöhnlich verwendeten Goldlösung mit bekanntem Metallgehalt eine verdünnte benutzt, zu der auf drei Teile Goldhydrosol ein Teil steriles Aq. dest. hinzugefügt war. Wird die 0,003 proz. Goldlösung auf das Doppelte mit Wasser verdünnt, so findet auch nach langer Einwirkung auf gut speichernde Hyphen keine unter dem Mikroskop bei gewöhnlicher Beleuchtung erkennbare Fixierung der Metallteilchen statt. Da noch nicht entschieden war, ob die Temperatur irgendeinen Einfluß auf dem Ablauf der fraglichen Reaktion hatte, so wurde bei diesen Versuchen darauf geachtet, daß sie bei merklichen Temperaturunterschieden, die während der ganzen Versuchszeit konstant gehalten wurden, durchgeführt wurden. Die Untersuchungen selbst wurden an jungen Aspergillus- niger- oder Penicillium- A-Mycel angestellt, das in irgendeinem flüssigen Substrat angewachsen war, und das in einem Reagensglase in die Goldlösungen eingelegt wurde. Das Mycel soll in jungem, kräftig wachsendem Zustande sein und darf noch nicht die festen unentwirrbaren Verschlingungen einer ausgewachsenen Pilzdecke zeigen; es müssen möglichst viele einzeln liegende Hyphen erkennbar sein.

Ich gebe im folgenden einen Auszug aus dem Protokoll einer Beobachtung an Penicillium- A-Mycel in der konzentrierten Goldlösung wieder. Für jede Beobachtung wurde etwas Mycel unter das Mikroskop gebracht, das direkt aus der konzentrierten Lösung stammte:

Tag der Beobachtung: 21. XI. 19. Temperatur: 35° C.

Reaktion der Goldlösung: schwach alkalisch.

Reaktion des Nährsubstrats der Pilze: deutlich sauer.

Name der Spezies: Penicillium A.

Zeit der Beobachtung:

12^h 15′: Einlegen des Mycels in die konz. Lösung.

12^h 30′: Makroskopisch: das Mycel hat schon einen schwach rosa Farbton. Mikroskopisch: (Vergrößerung etwa 600) wo die Hyphen dicht neben- und übereinanderliegen, zeigt sich ein rosa Schimmer, einzeln liegende Hyphen sind nicht gefärbt.

Digitized by Google

12h 45′: Makroskopisch: der rosa Farbton der Hyphen hat sich vertieft. Mikroskopisch: die einzeln liegenden Hyphen haben einen grauroten Farbton angenommen.

1h: Makroskopisch ebenso wie mikroskopisch: einzeln liegende Hyphen deutlich rosa gefärbt.

4h 30′: Makroskopisch: hochrote Farbe des Mycels. Mikroskopisch: das Mycel hat stark eingelagert. Die Membran ist gleichmäßig dunkelrot und hebt sich bei mittlerer Tubuseinstellung als dunkle Begrenzung von dem helleren mittleren Teil der Hyphe ab. In der Aufsicht sieht man eine gleichmäßig dunkelrote Fixierung und außerdem kleine rote Agglomerate von Gold, die auch in dünner Schicht um die Hyphe herum liegen. Die Hyphen sind stark verdickt. Die Lösung selbst ist deutlich heller rot als zu Beginn des Versuches, jedoch bei weitem nicht entfärbt.

Die erwähnte Zone von Goldanhäufungen um die Hyphen herum sah ich nur in der konzentrierten, nie in einer Lösung mit geringerer Konzentration.

Mit dieser konzentrierten Goldlösung wurden eine Reihe von Beobachtungen angestellt an Pilzen, die sich durch Kultivieren in den gewöhnlichen Hydrosolen als nicht speichernd gekennzeichnet hatten. Hierzu gehörte auch Oidium lactis. Nach 24stündiger Einwirkung der konzentrierten Lösung hat das Mycel noch nicht eingelagert, auch bei längerem Verweilen in der Goldlösung färbt es sich nicht. Auch bei der Bierhefe, die in gewöhnlicher, schwach alkalischer Goldlösung nicht speichert, zeigte es sich, daß diese negative Eigenschaft nicht beeinflußt wird durch die Konzentration des Hydrosols, sie lagert auch in konzentrierter Lösung nie ein. Von einer mehr oder weniger großen Konzentration der Metallteilchen im Dispersionsmittel kann also die Reaktion der Speicherung der „dispersen" Phase in keinem Falle abhängen.

Die Ergebnisse, die durch vergleichende Untersuchungen von Pilzmycel in Lösungen von verschiedener Konzentration bei verschiedenen Temperaturen gewonnen wurden, sind in Tabelle IX zusammengestellt. Aus ihr ist ersichtlich, daß der Beginn der Speicherung durch den entsprechenden Farbton der Hyphe um so schneller festzustellen ist, je größer die Anzahl der Goldteilchen im Dispersionsmittel ist. Aus ihr geht weiter hervor, daß die Temperatur innerhalb der angegebenen Differenzen bei der Infizierung durch die konzentrierte Lösung von keinem Einfluß ist, denn die Einlagerung zeigte bei verschiedenen Temperaturen nach der gleichen Zeit keinen Unterschied in der Intensität, der

Digitized by Google

Tabelle IX.

Einfluß der Konzentration und Temperatur auf die Goldspeicherung.

Material	Reaktion des Mycels	Konzentration der Lösung	Temperatur	Beginn der Speicherung	Temperatur	Beginn der Speicherung
Penicillium A	Sauer	Au_{40} 0,00225% Goldgehalt	35° C	nach 13 bis 15 Std.	5° C	nach 16 bis 18 Std.
„	„	Au_{40} 0,003% Goldgehalt	35° C	nach 4 bis 4½ Std.	5° C	nach 5 bis 8 Std.
„	„	Au_{40} 0,011% Goldgehalt	35° C	nach ½ Std.	5° C	nach ½ Std.

sich in dem mehr oder weniger dunklen Farbton der infizierten Hyphe deutlich ausspricht. Wohl aber ist bei niedriger Temperatur eine Verzögerung im Beginn der bemerkbaren Färbung des Mycels wahrzunehmen, wenn die Lösung weniger konzentriert ist.

Wenn wir die eben besprochenen Untersuchungen überblicken, so können wir die Ergebnisse kurz folgendermaßen zusammenfassen: Die Goldspeicherung hat für die betreffenden Pilze außer einer Verzögerung des Fruktifikationseintrittes und der im vorigen Kapitel besprochenen geringen Zurückhaltung im Längenwachstum der Hyphen keine schädlichen Folgen; sie ist ein Vorgang, der während des Lebens der Hyphen eintritt und am lebenden Material weitaus regelmäßiger und intensiver verläuft als am toten. Von der Speicherung wird nur die Membran betroffen, die aber keine chemische Verbindung mit dem Gold eingeht. Das Metall bleibt in elementarem Zustande erhalten. Die Unterschiede der Konzentration und der Temperatur sind nur von gradueller, nicht von wesentlicher Bedeutung für die Einlagerung.

Literatur.

Adler, Über Eisenbakterien u. ihre Beziehung z. d. therapeutisch verwendeten nat. Eisenwässern. Zentralbl. f. Bakt. **2**, 11. 1903. — Bankroft, Über die Gültigkeit des Pflügerschen Gesetzes f. d. galvanotrop. Reaktionen d. Paramaecien. Arch. f. Physiol. **107**. 1905. — Bechold, Die Ausflockung v. Suspensionen bzw. Kolloiden und die Bakterienagglutin-

Digitized by Google

nation. Zeitschr. f. phys. Chem. 48, H. 4. 1904. — Berthold, Studien über Protoplasmamechanik. Leipzig. 1886. — Bitter, Über Absterben von Bakterien auf wichtigeren Metallen und Baumaterialien. Zeitschr. f. Hyg. 1911. — Carl, Med. Klin. 1919, Nr. 7. — Christians, Die Bedeutung gediegener Metalle als Desinfektionsmittel. Desinfektion 1911. — Coehn u. Barrat, Zeitschr. f. allgem. Physiol. 1905. 5. — Engelen, Über die wissenschaftlichen Grundlagen der Fulmargintherapie. Ärztl. Rundschau 1912/13. — Engelmann, Botan. Ztg. 1899. — Friedenthal, Über kolloide Silberlösungen und ihre Anwendung in der Heilkunde. Therap. d. Gegenw. Juli 1918. — Ders., Über absolute und relative Desinfektionskraft, Diese Zeitschr. 94. 1919. — Galecki, Koagulationsstudien am Goldhydrosol. Zeitschr. f. anorg. Chem. 74, 1912. — Graham, Liquid Diffusion applied to Analysis. Philos. Transac. of the Roy. Acad. of London 1862. — Haenicke, Vererbungsphysiologische Untersuchungen an Arten v. Penicillium und Aspergillus. Zeitschr. f. Bot. 8, 1916. — Hertwig, Lehrbuch der Zoologie. Jena. 1905. — Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 4. Aufl. Leipzig und Berlin. 1914. — Klebs, Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Flagellaten. Untersuchungen a. d. bot. Inst. zu Tübingen. 1886. Bd. II. — Kükenthal, Zoologisches Praktikum. Jena 1905. — Lieske, Untersuchungen über die Physiologie eisenspeichender Hyphomyceten. Jahrb. f. wissensch. Botanik 50. H. 3. — Lindner, Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. Berlin. 1901. — Matsunaga, Experimentelle Untersuchungen über die baktericide Wirkung der Metalle Kupfer und Silber „in vivo". Zentralbl. f. Bakt. I, Bd. 82. — Michaelis, Diese Zeitschr. 24, 30, 33, 47. — Ders., u. Ehrenreich, Diese Zeitschr. 22. 1908. — Ders. u. Rona, Diese Zeitschr. 98. 1919. — Molisch, Die Eisenbakterien. 1910. — Moenees, Die Behandlung d. aktuen Gelenkrheumatismus mit elektrokolld. Silberpräparaten. Therap. d. Gegenw. 1917. — Nikitinsky, Über die Beeinflussung d. Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprdoukte. Jahrb. f. wissensch. Botanik 40. 1904. — Paal, Über kolloid. Gold. Ber. d. dtsch. chem. Ges. 35, 2. 1902. — Ders., Über kolloid. Silberoxyd. Ber. d. dtsch. chem. Ges. 35, 2. 1902. — Pfeffer, Pflanzenphysiologie. Leipzig. 1897. Ders., Osmotische Untersuchungen. 1877. — Ders., Über die Aufnahme der Anilinfarben in lebende Zellen. Unters. a. d. bot. Inst. zu Tübingen. 2. 1886. — Saida, Über die Assimilation freien Stickstoffs durch Schimmelpilze. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 19, 1901. — Tammann, Über die Permeabilität d. Niederschlagsmembranen. Zeitschr. f. physikal. Chemie. 1892. — Traube, Theorie d. Osmose u. Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. 1904. — Ders., Über Katalyse. Arch. f. d. ges. Physiol. 153. 1913. — Voigt, Über die Verteilung d. kolloid. Jodsilbers im Säugetierkörper. Diese Zeitschr. 89. 1918. — Ders., Biolog. Untersuchungen über kolloid. Silber. Dtsch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 10. — Wehmer, Über den Einfluß der Temperatur auf die Entstehung von Oxalsäure. Ber. d. Deutschen bot. Ges. 9, 1891. — Williams, Absorption of Gold from colloid. solutions by Fungi. Ann. of Bot. 32. 1918. — Wöltje, Unterscheidung

Digitized by Google

einiger Pen. Arten n. physiol. Merkmalen. Zentralbl. f. Bakt. **2**, 48. 1918. — Zsigmondy, Bemerkungen zu der Abhandlung „Über die Natur der sog. kolloid. Metallösungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**. 1900. — Ders., Annalen d. Chemie u. Pharmazie **301**. 1898. — Ders., Zur Erkenntnis der Kolloide. Jena. 1905. — Ders., Kolloidchemie. 2. Aufl. Leipzig. 1918. — Ders., Einige bemerkenswerte Eigenschaften d. kolloid. Goldes. Zeitschr. f. anorg. Chemie **96**. 1916. — Ders., Über „Lösungstheorien" und „Suspensionstheorie". Kolloid-Zeitschr. **26**, H. 1. 1920. — Ders., Über Koagulation u. Teilchenattraktion. Zeitschr. f. phys. Chem. **42**, H. 5. 1918.

Digitized by Google

Der Einfluß der kolloidalen Metallösungen nach Übertragung des Pilzmycels aus verschiedenen Nährsubstraten.

Von

Olga von Plotho.

(Aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 15. Juni 1920.)

Um die Ursache der Goldspeicherung aufzufinden und zu erklären, zeigte es sich als weiterführend, die betreffenden Pilze zunächst in einer bestimmten Nährlösung auszusäen, deren Zusammensetzung bekannt war, und deren Reaktion kontrolliert und auf Umsetzungen, die durch das Wachstum des Pilzes verursacht wurden, zurückgeführt werden konnte, und sie dann, nachdem die Hyphen gut entwickelt waren, aber ehe sich eine feste Decke gebildet hatte, in die Goldlösung zu übertragen.

In geschützten Lösungen fand auch bei auf diese Weise eingelegtem Mycel bei genügend großem Zusatz von Schutzkolloiden nie Metalleinlagerung statt. Als Schutzmittel verwendete ich, wie erwähnt, in den besprochenen Kulturen stets Gelatine. Der Zusatz von 0,05% erwies sich als nicht vollkommen schützend, wenn ich kräftig entwickeltes Pilzmycel aus einer Nährlösung mit saurer Reaktion in ein so geschütztes Goldhydrosol übertrug. Das Mycel war nach etwa 48 Stunden schwach graurötlich gefärbt. Es wurde daher 0,16% Gelatine hinzugesetzt. Jetzt zeigte sonst ausgezeichnet einlagerndes Mycel aus den verschiedensten sauren Nährsubstraten und von den verschiedensten Pilzen auch nach vier Tagen keinerlei Beeinflussung. Da dieses Ausbleiben der Reaktion nicht jedesmal von neuem angeführt werden soll, beziehen sich alle Angaben in den Tabellen dieses Kapitels, auch wenn das nicht besonders angegeben ist, auf ungeschützte Lösungen Die Notwendigkeit eines verhältnis-

Digitized by Google

mäßig so großen Zusatzes von Gelatine erklärt sich daraus, daß der Pilz das Albuminoid angreift und zum Aufbau seines Körpers verwendet, so daß immer mehr oder weniger große Mengen von Teilchen ihres Schutzes beraubt werden.

Um festzustellen, ob das Ausbleiben der Speicherung von der Art des Schutzkolloids abhängig sei, wurde in besonderen Kulturen ein anderes organisches Kolloid, nämlich ein käufliches (wahrscheinlich mit Säure hergestelltes) Dextrin, als Schutzmittel zur Goldlösung hinzugesetzt. Hierzu muß bemerkt werden, daß Gelatine an sich ein ausgezeichnetes, Dextrin ein ziemlich schlechtes Schutzmittel ist, es war daher zu erwarten, daß zu dem gleichen Grad des Schutzes eine größere Menge von Dextrin als von Gelatine nötig sein würde. Nach Hinzufügen von 0,05% Dextrin lagerten auch Penicillium und Aspergillus in Ein- und Vielzellkulturen ein, ebenso fand Speicherung statt, wenn aus goldfreien Nährlösungen Mycel übertragen wurde. Es wurde dann 2% Dextrin hinzugefügt. Ein stärkerer Zusatz des Kolloids zur Goldlösung war nicht möglich, da die Viscosität zu sehr beeinflußt wurde. In den Vielzellkulturen von Aspergillus war am 3. Tag noch keine Einlagerung erfolgt, am 4. Tag jedoch zeigten die Hyphen schwach rosa Färbung. Penicillium zeigte sich am 4. Tag ebenfalls schwach graurot gefärbt. So schien es erwiesen, daß die Schutzwirkung von dem Grade des Schutzes und nicht von der Natur des Schutzkolloids abhängig sei. Um dies indes noch einmal zu prüfen, wurde nur soviel Gelatine der Goldlösung hinzugesetzt, daß der Schutz der von Zsigmondy angegebenen Goldzahl entsprach[1]). Penicillium und Aspergillus lagerten beide schon am 2. Tage ein.

Es ergibt sich: Die Schutzwirkung organischer Kolloide in bezug auf die Speicherung des Metalls durch Pilzhyphen ist von der Art des Schutzkolloids nicht abhängig. Wesentlich ist nur die Menge des zugesetzten Kolloids, also der Grad des Schutzes.

Bei vollständigem Schutz findet keine Metallspeicherung statt. Trotz des Verbrauchs der eingelegten Organismen an organischem Kolloid werden die Metallteilchen nicht ihres Schutzes beraubt. Bei schwächerem Schutz werden die Schutz-

[1]) Die Goldzahl bezeichnet die Menge von Schutzkolloid in mg, die ein bestimmtes Volum Goldlösung gegen die Einwirkung einer abgemessenen Menge von Kochsalzlösung zu schützen vermag.

Digitized by Google

stoffe ebenfalls angegriffen, und nach bestimmter Zeit werden einige Metallteilchen schutzkolloidfrei: diese werden dann gespeichert. Die Speicherung ist in bestimmter Zeit um so intensiver, je geringere Mengen von Schutzkolloiden im lyophoben Kolloid enthalten sind. Ist gar kein Schutzkolloid vorhanden, (ungeschützte Goldhydrosole), so findet bei Organismen, die diese Reaktion überhaupt zeigen, Fixierung der Metallteilchen statt, die nach einiger Zeit durch Auftreten der entsprechenden Färbungen sichtbar wird.

Es braucht nach dem Vorigen kaum darauf hingewiesen zu werden, daß die auf S. 18 erwähnten schwach roten (durch das Gold hervorgerufenen) bzw. schwach gelben (durch Silber verursachten) Färbungen an dicht liegenden Mycelstellen bei Kulturen aus geschützten Lösungen zurückzuführen sind auf ungenügenden Schutz der Metallteilchen. Die unverdünnten Silberlösungen enthalten sehr viel Schutzkolloid. In sie übertragene Hyphen speichern daher die Silberteilchen nicht. Wird die Lösung verdünnt, so wird damit ihr Schutz geringer. Wenn z. B. das Elektrokollargol so weit verdünnt ist, daß sein Metallgehalt gleich dem des Goldes ist, so beträgt sein Gehalt an Schutzstoffen 0,05%. Dieser wird hervorgerufen durch Eiweißstoffe, die etwa die gleiche Schutzkraft besitzen wie die Gelatine. Diese Menge genügt aber nicht, wie eben am Gold, dem ich den gleichen Grad des Schutzes durch Gelatine erteilte, gezeigt wurde, um Speicherung dauernd zu verhindern. Auf den in die verdünnte Silberlösung übertragenen Mycelien erscheinen gelbe Färbungen, die sich nach und nach vertiefen, bis sie einen schön braunen Ton zeigen. Der Vorgang ist dem in der Goldlösung vollständig an die Seite zu stellen. Wird den verdünnten Silberlösungen vor Einlegen des Mycels ein Schutzkolloid hinzugefügt, so bleibt die Färbung der Hyphen aus. Genau so verhält sich die kolloidale Kupferlösung. Kräftig wachsende Mycelfäden, die in sie übertragen werden oder in ihr gewachsen sind, nehmen, wenn sie genügend verdünnt ist, eine braune Farbe an.

Zum Anwachsen der Pilze wurde als Nährsubstrat häufig die beschriebene Ammonnitratlösung benutzt. Sie erwies sich als besonders günstig, weil in ihr viele Spezies gediehen. (Aspergillus- und Penicilliumarten, Citromyces, Botrytis, Monilia, Dematium, Oidium lactis, Fusarium.)

Viele Pilze machen ihre Nährlösung deutlich sauer. Der Grad dieser Säuerung ist für Penicilliumarten so charakteristisch, daß er von Wöltje[1]) als physiologisches Unterscheidungsmerkmal angegeben wurde. Die Säure stammt entweder von dem unverbrauchten Reste einer Substanz der Nährlösung [z. B. $(NH_4)_2SO_4$] oder entsteht als Umsetzungsprodukt aus der Kohlenstoffquelle (Zucker). Eine für die Pilze unschädliche Säure, nämlich Oxalsäure, wird, wie Wehmer[2]) zuerst feststellte, in der Ammon-

[1]) Wöltje l. c.

[2]) Wehmer, Ber. d. dtsch. bot. Ges. 9, 163. 1891.

Digitized by Google

nitratlösung von Aspergillus- und Penicilliumarten in reichlichem Maße gebildet, und zwar um so mehr, je niedriger die Temperatur bei der Entwicklung der Kulturen gehalten wird.

Die durch Verbrauch von Stickstoff aus der NH_4-Gruppe frei werdende Salpetersäure wird von den Organismen sogleich weiter zerlegt.

Aber nicht nur Aspergillus niger und glaucus, sowie sämtliche benutzten Penicilliumarten vergrößerten in charakteristischer Weise den auch in unbeimpftem Zustande vorhandenen, von dem KH_2PO_4 herrührenden schwachen Säuregrad der Ammonnitratlösung, auch die Kulturen von Citromyces gl. und Botrytis vulg. verursachten das gleiche Resultat. Dagegen ist nach einigen Tagen nach Kultur von Mucor, Monilia und Fusarium der Säuregrad der Lösung ein geringerer als er es am Impftage war, und Oidium lactis macht das Substrat sogar in verhältnismäßig kurzer Zeit alkalisch. Die genauen Zahlenverhältnisse sind aus der Tab. X zu ersehen. Die Kulturen wurden in kleinen Erlenmeyerkolben angelegt. Volum der Nährflüssigkeit: 12 ccm. Von diesem Volum wurden 4 Tage nach Impfung des Pilzes 5 ccm mit steriler Pipette entnommen. Ebenso wurde aus diesem Nährsubstrat etwas Pilzmycel in ungeschützte Goldlösung übertragen und in ihr 18—20 Stunden bei einer Temperatur von 18—20° C gelassen. Nach Verlauf von weiteren 2 Tagen wurden wieder 5 ccm Lösung auf ihren Säuregehalt geprüft und ein zweites Mal Mycel der Einwirkung der Goldlösung ausgesetzt. Um bei der Goldspeicherung ein zuverlässiges Resultat zu erhalten, darf das Mycel sich noch nicht zu einer Decke zusammengeschlossen haben, es müssen einzeln liegende Fäden vorhanden sein. Ich bin mir bewußt, daß die in Tab. X angegebenen Zahlen keinen Anspruch darauf erheben können, die Säureproduktion resp. den Säureverbrauch der Pilze in der angegebenen Zeit genau wiederzugeben, da ja durch die erste Entnahme die Menge des Nährsubstrats verringert wurde, die des Pilzmycels aber — wenn man von der geringen Entnahme für die Goldspeicherung absieht — gleich blieb. Aber hierauf kam es für die vorliegenden Untersuchungen nicht an. Es handelte sich darum, ob es möglich wäre, einen Parallelismus zwischen der Goldspeicherung und dem Säuregrad des Mediums, in dem der Pilz gewachsen war, und aus dem auf die Reaktion des Pilzmycels selber geschlossen werden konnte, festzustellen. Diese Wechselwirkung zwischen Reaktion des Substrats und Goldspeicherung geht aus Tab. X in klarster Weise hervor. Ist keine Säurebildung eingetreten, oder ist das Substrat sogar alkalisch geworden, so kommt keine Goldeinlagerung zustande, hatte eine kräftige Säureentwicklung stattgefunden, so war die Metallspeicherung ebenfalls eine gute; bei mäßiger Säurebildung war auch die Färbung des Mycels entsprechend geringer in der gleichen Zeitspanne. Ich versuchte, auch den Grad der Speicherung in der Tabelle zum Ausdruck zu bringen. In der Farbe des Mycels besitzen wir ein Mittel, um diesen zu erkennen. Am Beginn der Einlagerung ist das Mycel graurötlich gefärbt, geht die Speicherung weiter, so wird die Hyphe rosa und nimmt dann eine schön tiefrote Färbung an, die schließlich in eine blaurote bis schwärzliche übergeht. Das Endstadium wird in jedem Fall, aber nach verschiedener Zeit erreicht. Da bei den vorliegenden Beobachtungen die Zeit der Goldein-

Digitized by Google

Tabelle X.

Einwirkung der Reaktion des Nährsubstrats auf die Goldspeicherung. Ammonnitrat als N-Quelle. Volumen 12 ccm. Einwirken von $Au_{4\ \text{schwach alkalisch}}$ 18—20 Stunden.

Name der Spezies	Temperatur	Zur Neutralisierung von 5 ccm Substrat verbraucht an Baryt nach Tagen: [23,5 ccm Baryt = 10 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4]		Goldspeicherung nach Mycelübertragung an Tagen nach der Impfung (Goldlösung schwach alkalisch)	
		4	6	4	6
Sterile Nährlsg.	20—22° C	0,85 ccm			
Aspergillus nig.	20—22° C	1,01 „	4 ccm	+	+++**)
Aspergillus glaucus	12—15° C	0,91 „	1,6 „	±*)	+
Botrytis vulgaris	12—15° C	0,87 „	1,1 „	±	+
Citromyces glaber	12—15° C	0,9 „	2,3 „	+	+
Penicillium A	12—15° C	1,03 „	2,6 „	+	++***)
Penicillium glaucum	12—15° C	0,89 „	1,05 „	±	+
Penicillium Z	12—15° C	1,5 „	4,7 „	++	+++
Penicillium viridicatum	12—15° C	1,00 „	4,5 „	++	++
Penicillium olivaceum	12—15° C	1,04 „	2,5 „	++	++
Penicillium purpurogenum	12—15° C	—	1,9 „	+	+
Penicillium brevicaule	12—15° C	0,93 „	3,9 „	+	++
Penicillium II	12—15° C	—	1,8 „	+	+
Mucor mucedo	12—15° C	0,84 „	0,6 „	—	—
Monilia variab.	12—15° C	0,85 „	0,79 „	—	—
Dematium pull.	12—15° C	0,55 „	Lösung alkalisch	—	—
Oidium lactis	12—15° C	0,84 „	0,73 „	—	—
Fusarium sp.	12—15° C	0,85 „	0,72 „	—	—

*) ± = Die Färbung der Hyphe ist graurot (schwache Speicherung).
) +++ = sehr starke Speicherung. *) ++ = starke Speicherung.

wirkung immer die gleiche war, so ist die Farbe der infizierten Hyphe ein Gradmesser für die Schnelligkeit der Einlagerung, und diese geht, innerhalb der in der Tabelle angegebenen Grenzen des Säuregehaltes im Nährmedium, um so schneller vor sich, je saurer das Substrat ist, aus dem das Mycel stammt. War dagegen die Säurebildung schwach, so zeigte sich oft am 4. Tag in dem Mycel nur geringe graurote Färbung, wie z. B. bei Aspergillus gl. und Botrytis. Am 6. Tage hatten bei weitergehender Ansäuerung des Substrats die Hyphen dann nach gleich langer Goldeinwirkung einen schön roten Farbton erlangt.

Es erschien nun als das Gegebene, eine bestimmte Säuremenge gleichzeitig mit der Impfung eines Pilzes zu der Ammonnitratlösung hinzuzusetzen und dann zu vergleichen, ob das

Digitized by Google

Mycel aus dem angesäuerten Substrat nach der gleichen Zeit der Goldeinwirkung einen tieferen Farbton zeigte als das aus dem nicht angesäuerten. Aber die zugesetzten Säure durfte den Organismus in seiner vegetativen Entwicklung nicht hindern. Es ist bekannt, daß Penicilliumarten durch einen ziemlich hohen Grad von Milchsäure im Nährsubstrat nicht nur nicht geschädigt werden, sondern daß die Pilze die Milchsäure sogar zerlegen und als Energiematerial verwenden. Da mein Penicillium glaucum in der nicht angesäuerten Lösung nach 4 Tagen nur schwache Färbung der Hyphen zeigte, erschien es zu diesen Versuchen gut geeignet zu sein. Daher wurde zu der gewöhnlichen Ammonnitratlösung ein Gehalt an Milchsäure von 0,22% hinzugegeben; das Substrat hatte, dann einen höheren Säuregrad als die 4 Tage von Penicillium gl. angesäuerte Ammonnitratlösung. Nach Übertragung in Gold am 4. Tag nach der Impfung zeigten die Hyphen, wenn sie durch sorgsames Auswaschen in dest. sterilem Wasser von anhaftenden Säureresten befreit waren, eine schön rote Färbung, die nach der gleichen Zeit der Goldeinwirkung einen höheren Grad von Metallspeicherung erkennen ließen, als das Pen.-gl.-Mycel aus der nicht angesäuerten Nährlösung. Wurde die dem Mycel anhaftende Säure nicht genügend entfernt, so fand eine viel geringere Speicherung statt. Das Metall wurde dann um die Fäden herum ausgefällt und haftete in kleinen Agglomeraten an ihnen. Den für die Speicherung optimalen Säuregehalt im Medium zu bestimmen, geht aus leicht einzusehenden Gründen nicht an, es kann nur gesagt werden, daß bei Übertragung des Mycels in Au_4 nicht mehr als 22—23. 10^{-3} Milliäquivalent Oxalsäure in 10 ccm Goldlösung hineingebracht werden dürfen, weil sonst die Lösung sofort koaguliert und keine Speicherung eintritt.

In allen durch die Pilze veränderten Substraten wurde das Nährmedium durch organische Säuren angesäuert. In den meisten Fällen kommt hierbei die Oxalsäure in Betracht. Es konnte also als sicher gelten, daß bei Gegenwart von Oxalsäure die Goldspeicherung gut vor sich geht. Ebenfalls findet sie, wie die zuletzt besprochenen Versuche zeigten, bei Gegenwart von Milchsäure statt. Außerdem wird von Citromyces aus der verwendeten Nährlösung Citronensäure frei gemacht[1]), und Citromyces ist ein Organismus, der das Gold vorzüglich fixiert. Es

[1]) Kochs Jahresbericht 4, 268. 1893.

Digitized by Google

erhob sich nun die Frage, ob vielleicht nur organische Säuren befähigt seien, diese Reaktion auszulösen. Zur Beantwortung dieser Frage war es nötig, ein Medium zu finden, in dem durch die Tätigkeit der Pilze eine anorganische Säure in Freiheit gesetzt wird, in dem aber keine organische vorhanden ist. Diese Bedingung wurde erfüllt, wenn an Stelle von Ammonnitrat Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle gegeben wurde[1]). Bei Kultur von Asp. nig. bildet sich dann auch Oxalsäure. Diese wird aber sofort wieder zersetzt, so daß sich im Substrat nur Schwefelsäure findet, die nach Entnahme des Stickstoffs aus dem Ammoniak durch den Pilz in Freiheit gesetzt wird. Nachdem das Mycel das für die Goldspeicherung günstige Stadium erreicht hatte, wurde es in das Hydrosol übertragen. Es speicherte das Metall gut und schnell.

Wenn die vorstehend gemachten Ausführungen, daß nämlich die Goldspeicherung gebunden sein soll an einen gewissen Säuregrad, richtig sein sollen, so muß auch bei der Entwicklung der zahlreichen Penicilliumarten, die spontan im Goldsol auftreten und das Metall kräftig in ihrer Membran verdichten, eine solche Ansäuerung stattfinden, von der angenommen werden kann, daß sie sich bei genügend langer Kultur der Pilze im Kolloid nachweisen lassen wird. Eine weitgehende Ansäuerung der Goldlösung fand jedenfalls nicht statt, denn sie koagulierte niemals, auch wenn wochenlang Schimmelpilze in ihr wuchsen. Das war nicht verwunderlich, denn die beträchtlichen Säuregrade in einer Pilznährlösung entstehen mehr oder weniger direkt aus den in ihnen enthaltenen chemischen Verbindungen (im Falle der Oxalsäurebildung bei Aspergillus und Penicillium, z. B. durch Oxydation aus dem Zucker. Solche Verbindungen sind aber in der Goldlösung nicht vorhanden. Um festzustellen, ob eine aus komplizierteren Prozessen des Eiweißzerfalls entstehende Kohlensäurewirkung nachzuweisen war, impfte ich in einem Gefäß aus Jenaer Glas in steriler Goldlösung Au_4 (die Lösung verträgt die Behandlung im Wasserdampf) einen Pilz, Penicillium Z, den ich aus einer anderen Goldlösung isoliert hatte, und der leicht und verhältnismäßig üppig in den Lösungen des Goldes wuchs und fruktifizierte. Die vor der Impfung festgestellte Alkalescens der

[1]) Kruse, Mikrobiologie. Leipzig 1910. S. 392.

Digitized by Google

Lösung ergab einen Gehalt von 0,0214% K_2CO_3. Nachdem der Pilz einen Monat in der Lösung gewachsen war, war der Gehalt an K_2CO_3 gesunken auf 0,0115%, nach weiteren 6 Wochen waren nur noch 0,0076% K_2CO_3 nachweisbar. Damit ist bewiesen, daß Penicillium die reine Goldlösung in geringem Grade, wenn auch in langer Zeit ansäuert.

Wir sahen also Goldspeicherung eintreten in Gegenwart der verschiedensten Säuren und bei mannigfachen Pilzarten:

Verwendete Spezies	Nährsubstrat	Vorherschende Säure	Speicherung in Au_4 schwach alkal.
Aspergillus niger	Ammonnitratlösung	Oxalsäure	+
Citromyces glaber	Ammonnitratlösung	Citronensäure	+
Penicillium glaucum	Ammonnitratlösung + Milchsäure	Milchsäure	+
Aspergillus niger	Ammonsulfatlösung	Schwefelsäure	+
Penicillium Z	Goldlösung	Kohlensäure	+

Von einer spezifischen Wirkung irgendeines dieser so verschiedenen Körper — anorganische Säuren, organische Säuren mit normaler Kohlenstoffkette, eine Tricarbonsäure — war nichts zu bemerken; bei allen genügte ein geringer Säuregrad, um schwache Speicherung zu veranlassen, während bei steigendem Säuregehalt stärkere Fixierung des Metalls aus den Kolloiden einsetzte.

Es erhob sich nun die Frage, ob ein bestimmter Säuregrad des Nährsubstrats überhaupt nötig ist, um Speicherung hervorzurufen.

Um diese Frage beantworten zu können, wurde der Ammonnitratlösung eine bestimmte Menge von Calciumcarbonat zugesetzt, das die entstehenden freien Säuren sofort festlegte.

Die Menge der gebildeten Oxalsäure ist bei Aspergillus niger verschieden (abhängig von der Temperatur), bei den bisher von mir beobachteten Kulturen fanden sich bei einer Temperatur von 22—25° C höchstens 40% des Zuckers, meistens nur 33—35% als Oxalsäure wieder, daher setzte ich bei einem Gehalt von 3% Dextrose 1,66% $CaCO_3$ zu[1]). Um aber ganz sicher zu sein, daß die gebildete Säure stets vollkommen neutralisiert wurde, gab ich zu anderen Kulturen größere Mengen von $CaCO_3$ hinzu. Die näheren Angaben finden sich in Tab. XI. Der stark säuernde Aspergillus niger, sowohl als auch das schwach Säure produzierende Penicillium glaucum lagerten beide ein, als ob sie in einer Lösung ohne Calciumcarbonatzusatz gewachsen wären. Allerdings war die Färbung der Hyphen sehr schwach und vertiefte sich auch bei langem Verweilen in der Goldlösung nicht wesent-

[1]) Vgl. Lafar, Handbuch der Mycologie 3.

Digitized by Google

lich. Die Reaktion der Nährlösung war stets neutral. Vom Vorhandensein eines in dem Nährsubstrat nachweisbaren Säuregrades konnte also das Eintreten der fraglichen Reaktion nicht abhängen. Solche Organismen, die überhaupt Säure entwickeln, zeigen, wenn auch in geringerem Grade, die Metallfixierung auch, wenn die gebildete Säure nicht im Substrat nachweisbar ist.

Tabelle XI.

Festlegung der gebildeten Säuren durch $CaCO_3$. Kohlenstoffquelle: 3% Dextrose; Stickstoffquelle: Ammonnitrat.

	Aspergillus niger			Penicillium glaucum		
Zuzatz von $CaCO_3$	1,66%	2%	5%	1,66%	2%	5%
Reaktion am 4. Tag nach der Impfung	neutral	neutral	neutral	neutral	neutral	neutral
Speicherung (Lösung: Au_4 schwach alkalisch)	±*)	±	±	±	±	±
Reaktion am 7. Tag nach der Impfung	neutral	neutral	neutral	neutral	neutral	neutral
Speicherung (Lösung: Au_4 schwach alkalisch)	±	±	±	±	±	±

*) ± = schwache Speicherung.

Bisher experimentierten wir mit Lösungen, in denen während der Pilzkultur saure Reaktion herrschte. Die letzten Versuche wurden in neutralem Medium angestellt. Darauf wurde zu Nährsubstraten übergegangen, in denen während der Pilzkultur alkalische Reaktion herrschte resp. entstand. Von Nikitinsky[1]) sind zwei Lösungen angegeben worden, deren Reaktion in unbeimpftem Zustande sauer ist, die aber durch das Wachstum der Pilze eine alkalische Reaktion annehmen. Die Zusammensetzung beider wurde schon angeführt. Wenn Salze organischer Säuren (in unserem Falle weinsaures Kalium) als einzige Kohlenstoffquelle gegeben werden, so werden die Basen frei, die von starken Säurebildnern neutralisiert werden können, bei schwach säuernden Organismen aber die Kulturflüssigkeit alkalisch machen. Die Pilze werden dann in ihrer Entwicklung gehemmt, aber das war für uns nicht wesentlich. Wird Ammoniumtartrat als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle gegeben, so beruht die Zunahme des Alkalescenzgrades darauf, daß die Anionen der Verbindung vom Pilz schneller verarbeitet werden als die Kationen[2]). Da es mir darauf ankam, das Mycel von Pilzen, die aus sauren Medien in Gold übertragen, Speicherung zeigen, auf diese Reaktion zu prüfen, wenn sie aus alkalischem Medium stammen, so verwendete ich für diese Züchtungen natürlich einen

[1]) Nikitinsky, Jahrb. f. wissensch. Botanik 40. 1904.

[2]) Czapek und Kohn fanden dasselbe an einer Lösung mit Ammonacetat als Kohlen- und Stickstoffquelle. Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. 8. 1906.

Digitized by Google

Pilz, der die Fähigkeit, Säure zu bilden, nur in geringem Grade besitzt. Schon Nikitinsky fand, daß bei Kulturen von Penicilliumarten in seinen Lösungen die Alkalescenz am größten wurde. Es wurde bei diesen Versuchen so verfahren, daß zunächst ein kleiner Erlenmeyerkolben mit Penicillium glaucum beeimpft wurde. Nach 16—18 Tagen wurde diese Kultur abfiltriert. Das Filtrat reagierte stark alkalisch, wie aus Tab. XII zu ersehen ist. Nach seiner Sterilisation wurde es ein zweites Mal mit Penicillium glaucum beimpft. Der Pilz entwickelte sich nur noch kümmerlich, die Keimung verzögerte sich. Nach einer Woche ist das Mycel in dem gewünschten Zustande, es wird in Gold übertragen. Speicherung findet nicht statt.

Tabelle XII.

Einfluß der Reaktion des Nährsubstrats auf Penicillium glaucum.

Penicillium glaucum	Weinsaures Kalium als Kohlenstoffquelle Ammonnitrat als Stickstoffquelle	Ammontartrat als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle
Reaktion des unbeimpften Substrats	sauer	sauer
Dauer der ersten Kultur	18 Tage	17 Tage
Alkalescenzgrad der Lösung nach der ersten Kultur vor dem Sterilisieren (umgerechnet auf NH_3)	0,023%	0,029%
Alkalescenzgrad nach dem Sterilisieren	0,0047%	0,0063%
Dauer der zweiten Kultur	8 Tage	7 Tage
Alkalescenzgrad des Substrats nach der zweiten Kultur (umgerechnet auf NH_3)	0,035%	stark alkal.
Goldspeicherung (Lösung: Au_4 schw. alk.)	—	—
Färbung des Mycels mit Anilinblau	Mycel lebt	Mycel lebt
	Überimpfen des Mycels in Ammonnitratlösung	
Dauer der Kultur	3—4 Tage	4 Tage
Reaktion der Ammonnitratlösung	sauer	sauer
Goldspeicherung (Lösung: Au_4 schw. alk.)	+	+

Diese zweimalige Kultur war nötig, weil die Decke der ersten Kultur zur Übertragung in die Goldlösung keine einzelnen Hyphen mehr zeigt, wenn der Alkalescenzgrad so hoch ist, daß die Einlagerung ausbleibt. Und nur bei einzeln liegenden Hyphen ist das Resultat der Speicherungsreaktion, wie schon hervorgehoben, ein sicheres. Wurden in das schon alkalisierte Substrat zum zweitenmal Sporen eingesät, so zeigten auch junge, einzeln liegende Hyphen nie Einlagerung. Wurden dann diese jungen Hyphen in Ammonnitratlösung gelegt, so wuchsen sie kräftig weiter, säuerten die Lösung an, und es lagerten, wenn sie einige Tage später in Goldhydrosol übertragen wurden, die meisten kräftig ein.

So können wir nach unserem Belieben bei dem Mycel des gleichen Pilzes einmal die Speicherung erzielen, und das andere Mal diese völlig verhindern, je nachdem der Pilz in saurem oder

Digitized by Google

in alkalischem Medium gewachsen ist. Voraussetzung ist dabei, daß der Pilz selbst kein allzu starker Säurebildner ist. Ich habe sehr viele derartige Versuche mit Aspergillus nig. gemacht, die sämtlich mißlangen. Das Substrat wird durch die entstehende Oxalsäure immer wieder neutralisiert.

Es lag nahe, nun einen Pilz in der Ammonnitratlösung zu kultivieren, nachdem diese vor der Impfung alkalisch gemacht worden war (Tab. XIII). Der Alkalescenzgrad der Lösung durfte dabei nicht zu hoch bemessen werden, denn die Pilze vertragen bekanntlich nur eine sehr geringe Menge freien Alkalis. Ferner durften wieder keine starken Säurebildner verwendet werden, denn dann entstanden in der Lösung wieder die gleichen Verhältnisse wie in Medien mit saurer Reaktion. Es besteht bei

Tabelle XIII.

Penicillium glaucum in Ammonnitratlösung mit alkalischen Zusätzen. Temperatur 15—18° C.

Penicillium glaucum	Ammonnitratlösung +0,085% NH_3	Ammonnitratlösung +0,0824% NaOH	Ammonnitratlösung +0,142% K_2CO_3
Reaktion des sterilen Substrats	alkalisch	alkalisch	alkalisch
Reaktion des Substrats am 3 Tage nach der Impfung	neutral	neutral	alkalisch
Goldspeicherung (Lösung: Au_4 schwach alkalisch)	±*)	±	—
Reaktion des Substrats am 7 Tage nach der Impfung	sauer	sauer	sauer
Goldspeicherung (Lösung: Au_4 schwach alkalisch)	+	+	+

*) ± = schwache Speicherung.

diesen Versuchen eben der grundlegende Unterschied, daß diese alkalisierte Lösung durch die Tätigkeit der Pilze wieder angesäuert wurde, während die Lösungen Nikitinsky I und II durch die Entwicklung der Pilze gerade in höherem Maße mit Alkali angereichert wurden. Sollten die Ergebnisse in der alkalisierten Lösung abweichen von denen in der gewöhnlichen Ammonnitratlösung, so mußte die Reaktion solange als möglich alkalisch bleiben.

Penicillium gl. ist ein schwacher Säurebildner, und verträgt andererseits relativ große Mengen von Alkali. Zur Alkalisierung des Substrats wählte ich verschiedene Verbindungen, um festzustellen, ob sich eine

Digitized by Google

spezifische Wirkung eines Stoffes erkennen ließe. Außer NH_3 wurden K_2CO_3 und NaOH der Nährflüssigkeit zugesetzt. Da durch die vorigen Versuche festgestellt worden war, wie hoch der Prozentgehalt an freiem Ammoniak etwa sein durfte, um noch leidliches Wachstum zu ermöglichen, so berechnete ich danach die entsprechende Menge Natronlauge und Kaliumcarbonat. Nach Zusatz der berechneten Mengen wurden dann 20 ccm Nährflüssigkeit in einem kleinen Erlenmeyerkolben beimpft. Nach einigen Tagen waren die Sporen in allen Kolben leidlich gekeimt und wuchsen mit ungefähr gleicher Intensität weiter. In den Kolben mit Kaliumcarbonat blieb die alkalische Reaktion immer längere Zeit nachweisbar als in den Kulturen mit Ammoniak- und Natronlaugezusatz. — Die genauen Zahlen des Alkalizusatzes usw. sind aus Tab. XIII zu ersehen. Die Wachstumsintensität des Pilzes wird durch die so bemessenen Zusätze verringert, es kommt aber zur Fruktifikation. Bei dem doppelten Alkaligehalt kommt kein Wachstum mehr zustande, während die Hälfte des angegebenen Alkalizusatzes den Pilz in seiner Entwicklung nicht beeinträchtigt.

Das aus saurer Lösung gut speichernde Mycel reagiert aus allen dreien mit den verschiedenen Stoffen alkalisierten Medien in der gleichen Weise: die Reaktion bleibt aus, solange die Lösung noch alkalisch ist, sie tritt ein, sobald diese neutral wird, und zeigt sich deutlicher bei Vorhandensein nachweisbarer Säuremengen. Eine spezifische Wirkung irgendeiner der drei verwendeten Alkalien hatte sich nicht gezeigt.

Wenn wir die Resultate der bisherigen Versuchsreihen überblicken, so sehen wir, daß ein Teil der untersuchten Organismen die Fixierung der Metallteilchen aus schwach alkalischen Goldlösungen nie zeigte. Bei einem anderen Teil dagegen tritt unabhängig von der Art der Säure deutliche Metallspeicherung aus schwach alkalischen Goldlösungen ein, beim Vorhandensein einer sauren Reaktion in der Umgebung der Hyphen (Tab. X). Wird die Reaktion im Medium neutral, so fixieren die Mycelien die Metallteilchen viel weniger energisch (Tab. XI) und bei alkalischer Reaktion der Umgebungsflüssigkeit bleibt die Fixierung aus (Tab. XII und XIII), unabhängig von der Natur der Base, die den Alkalescenzgrad verursachte. Wir dürfen also jetzt sagen, daß der Eintritt resp. der Ausfall der Goldspeicherung nicht abhängig sein kann von dem Vorhandensein einer bestimmten chemischen Verbindung, sie muß zusammenhängen mit der Reaktion in der Umgebung der fixierenden Hyphen.

Um das noch einmal zu prüfen, wurden zu Au_4 (schwach alkalisch) ungleich große Zusätze von verschiedenen alkalisch reagierenden Salzen gemacht, so daß also die Lösungen einen durch verschiedene Substanzen hervorgerufenen ungleich großen

Digitized by Google

Alkalescenzgrad erhielten. Um gleichzeitig zu zeigen, daß osmotische Druckdifferenzen ohne Einfluß auf die Speicherung sind, fügte ich zu dem ursprünglichen Hydrosol Zusätze eines Neutralsalzes [NaCl] hinzu, das auf die Reaktion keinen Einfluß hat, durch das aber isotonische Lösungen geschaffen wurden. (Tab. XIV).

Tabelle XIV.

Salzzusätze zur Goldlösung und ihr Einfluß auf die Speicherung Goldeinwirkung 18—20 Stunden.

Name der Spezies	Speicherung in Au_4 mit 0,215% NaCl-Gehalt = 1,7 Atm.	Speicherung in Au_4 mit 0,09% NaCl-Gehalt = 0,88 Atm.	Speicherung in Au_4 mit 0,2% K_2CO_3-Gehalt = 0,86 Atm.	Speicherung in Au_4 mit 0,16% NaOH-Gehalt = 1,7 Atm.
Aspergillus niger	+	+	—	—
Aspergillus glacuus	+	+	—	—
Penicillium A	+	+	—	—
Penicillium olivaceum	+	+	—	—
Citromyces glaber	+	+	—	—
Botrytis vulgaris	+	+	—	—
Mucor mucedo	—	—	—	—
Oidium lactis	—	—	—	—
Dematium pull.	—	—	—	—

Wir sehen, daß das Mycel der Pilze, wie schon hervorgehoben, seine Affinität zu den Metallteilchen ändert, sobald durch irgendeinen Faktor in seiner Umgebung die Reaktion geändert wird. Bei alkalischer Reaktion bleibt die Speicherung in sonst gut fixierendem Mycel aus. Hierzu ist zu bemerken, daß das Resultat ein unsicheres sein kann, wenn vor Einlegen des Mycels die Goldlösung genau auf den angegebenen (Tab. XIV) Alkaligehalt gebracht ist, und dieser durch stark saures Mycel wieder mehr oder weniger neutralisiert wird. Deshalb muß darauf geachtet werden, daß nach Übertragung des Mycels die angegebenen Alkalescenzgrade vorhanden sind. Für die stark alkalische Natronlauge-Goldlösung gibt die Tabelle das Maß des größtmöglichen Alkaligrades, der die Hyphen in der angegebenen Zeit nicht abtötet. Dies darf nicht eintreten, denn wir sahen, daß dann die Speicherung überhaupt schwächer wird. Wenn auf diese Faktoren geachtet wird, so bleibt das angeführte Resultat niemals aus. Die Wechselwirkung zwischen dem Ausbleiben, resp. dem Eintritt der Einlagerung und Alkaligehalt, resp. geringem

Digitized by Google

Säuregrad der Lösung geht so weit, daß dasselbe Mycel, welches in deutlich alkalischer Lösung gar nicht einlagert, vortrefflich fixiert, wenn die gleiche Goldlösung vorsichtig neutralisiert und in ganz geringem Grade angesäuert wird.

Bei dem Mycel der Pilze, die in der Ammonnitratlösung die saure Reaktion nicht vermehrten, sie im Gegenteil durch ihren Lebensprozeß teils um ein geringes, teils in beträchtlichem Grade alkalischer machten, bleibt auch, wie in Tab. XIV für Mucor, Oidium und Dematium hervorgehoben, eine Fixierung in stark alkalisch gemachtem Kolloid aus. Auf keine Weise gelang es, diese Organismen zum Einlagern zu bringen. Aus den angeführten Untersuchungen kam ich nun zu der Überzeugung, daß das Ausbleiben der Speicherungsreaktion in alkalischer Umgebung und, im Gegensatz dazu, der Eintritt in saurer eine allgemein gültige Regel sei. Ich verschaffte daher den nicht einlagernden Hyphen diese Umgebung durch Ansäuern des infizierenden Hydrosols. Man könnte mir entgegnen, daß der schwache Säuregrad der Ammonnitratlösung noch nicht neutralisiert war, daß aber dennoch die Organismen nicht einlagerten. Es ist richtig, daß die Nährlösung zu der in der Tab. X angegebenen Zeit noch immer sauer reagierte, der betreffende Pilz hatte also noch nicht genügend alkalische Stoffwechselprodukte gebildet, um durch sie den Säuregrad der Nährlösung zu neutralisieren. Aber die Tendenz dazu lag jedenfalls vor und ist aus Tab. X deutlich zu erkennen. Da die Alkalisierung aber von den Hyphen ausgeht, so ist anzunehmen, daß in ihrer unmittelbaren Umgebung die Lösung beträchtlich alkalischer ist, und daß die Zellen selbst eine alkalische Reaktion zeigen. (Ebenso kann wohl begründet angenommen werden, daß die Zellen der Organismen, die durch ihr Wachstum das Nährmedium so beträchtlich sauer machten, ihrerseits eine saure Reaktion zeigen.) Die in noch schwach sauer reagierendem Substrat liegenden Hyphen befinden sich also tatsächlich in alkalischer Umgebung, und ihr Alkaligrad wird noch erhöht durch die Übertragung in die ganz schwach alkalischen Goldlösungen. Wurden dagegen diese angesäuert, so war es vielleicht möglich, den schwachen Alkaligrad des Mycels zu paralysieren und es auf diese Weise zur Fixierung des Metalls zu bringen. Ich versetzte daher Au_4 mit einer geringen Menge von Oxalsäure, derart, daß ihr Gehalt daran zwischen 0,045%

Digitized by Google

und 0,022% schwankte. In der Tab. XV sind die Organismen angegeben, die in schwach alkalischer Goldlösung nie Infizierung zeigten, die aber in schwach saurem Hydrosol diese leicht erkennen ließen. Besonders hervorzuheben ist diese Tatsache für

Tabelle XV.

Einfluß der Reaktion in der Goldlösung auf die Speicherung. Einwirkung 18—20 Stunden.

Name der Spezies	Nährsubstrat	Reaktion des Nährsubstrats	Speicherung i. Au schwach alkal.	Speicherung i. Au schwach sauer
Mucor mucedo	Ammonnitrat-lösung	schwach sauer	—	+
Oidium lacdis	„	„	—	++
Dematium pull.	„	alkalisch	—	+
Monilia var.	„	schwach sauer	—	—
Ustilago hord.	Würze	„	—	+
Kahmhefe	„	„	—	+
Bierhefe	„	„	—	+
Bac. megatherium	Hefewasser	alkalisch	—	—
„ brassicae	„	„	—	—
Clonotrix fusca	Peptonwasser	„	—	—
Leptotrix	„	„	—	—
Beggiatoa minim.	Schlamm		—	—

Oidium lactis. Während das Mycel in Au_4 (schwach alkalisch) nie die geringsten Spuren von Färbung gezeigt hatte, färbten sich seine Hyphen und besonders die Conidien in schwach saurem Gold schnell und gleichmäßig tiefrot und schließlich blaurot. Dasselbe gilt für Mucor mucedo. Bei ihm waren besonders die in kräftiger Entwicklung begriffenen Sporangienträger und Sporangien gefärbt. Wurde der Gehalt an Oxalsäure in der Goldlösung auf 0,018% erniedrigt, so war keine Färbung zu bemerken. Seltener sind die Hyphen von Dematium pull. gefärbt, meistens zeigt nur ein verhältnismäßig geringer Teil von Conidien gleichmäßige, tief dunkelrote Einlagerung. Die Zellen werden durch das Gold nicht abgetötet, ich beobachtete junge Aussprossungen an tiefroten Conidien, die ungefärbt erschienen; andere zeigten bei gleicher Größe schon die dunkle Färbung. Bei Ustilago war die Zahl der Zellen, die in saurer Goldlösung mit einer gleichmäßigen Schicht von Gold überzogen schienen, ziemlich groß, kleiner bei einer Kahmhefe, bei der nur etwa 2% aller Zellen, nach 18stündiger Goldeinwirkung homogen rot bis rotviolett in der Lösung liegen. Warum gerade diese Individuen das Gold

Digitized by Google

fixiert haben, ist bei allen diesen Pilzen nicht erkennbar, denn sie zeigen keinerlei morphologische Besonderheiten, auch scheint das Alter der Zellen hier nicht in Frage zu kommen, wenigstens sind nicht alle gleicher Größe gefärbt. Es wird hierauf im nächsten Kapitel noch zurückzukommen sein. Nie sah ich trotz häufiger Impfungen in Goldlösung mit verschiedenem Oxalsäuregehalt, Speicherung bei Monilia var. Dies gilt auch für alle untersuchten Bakterienarten. Besonders hervorgehoben soll dies noch für die Eisenbakterien werden.

Aus allen diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Metallspeicherung allein beeinflußt wird von der in der Lösung bzw. im Mycel der Pilze herrschenden Reaktion. Diese aber wird hervorgerufen durch das Vorwalten der Wasserstoff- bzw. Hydroxylionen. Daraus dürfen wir weiter folgern, daß die Metallspeicherung aus unseren kolloidalen Lösungen eine Funktion der in der Umgebung des Mycels, bzw. in der der Metallteilchen vorherrschenden Wasserstoffionen ist.

Erklärung der Goldspeicherung.

In den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich ganz allgemein um Fragen der Teilchenaggregation in kolloidalen Lösungen Für diese gelten folgende Gesichtspunkte: Die Teilchenaggregation kann schon erfolgen, wenn die Ultramikronen gleiche Ladung haben, sie bleibt aber aus bei genügend starker gleicher Ladung. Sie tritt bei irresolubeln Hydrosolen stets ein, wenn die Teilchen entladen sind, also im isoelektrischen Punkt. Entgegengesetzt geladene Kolloide fällen sich stets aus, innerhalb der von Biltz[1]) näher charakterisierten Fällungszone[2]).

Wirken stofflich verschiedene Kolloide aufeinander ein, so werden diese Gesetzmäßigkeiten zum Teil durch spezifische Wirkung der in Betracht kommenden Stoffe überlagert, z. B. bei der Wechselwirkung zwischen Gold und Eiweiß. Die Wirkung zwischen dem ungeschützten bzw. geschützten Gold und den Hydrogelen der Membranen niederer Organismen ist in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert. Ich wiederhole jedoch, daß die beschriebenen Vorgänge sich nicht nur bei der Wechselwirkung

[1]) Biltz, Ber. d. Dtsch. chem. Ges. **37**. 1904.

[2]) Zsigmondy, Einige bemerkenswerte Eigenschaften des kolloidalen Goldes. Zeitschr. f. anorg. Chem. **96**. 1916.

Digitized by Google

zwischen den Gelen und den Teilchen des kolloiden Goldes abspielen, sondern daß sie auch eintreten bei Silber- und Kupferhydrosolen, wenn diese unter den gleichen Bedingungen mit den Gelen zusammen kommen.

In den Membranen der Organismen liegen Derivate von Eiweißstoffen vor. Es ist bekannt[1]), daß Proteide in saurer Lösung positiv, in alkalischer negativ geladen sind, und der isoelektrische Punkt verschiedener dieser Substanzen wurde als bei einer Wasserstoffionenkonzentration von ungefähr $2{,}10^{-5}$ Mol pro Liter liegend gefunden[2]). Bei höherer Wasserstoffionenkonzentration ist Eiweiß positiv elektrisch geladen, unabhängig von der Größe seiner Teilchen. Auch für die Membranteilchen der untersuchten Organismen gelten diese Gesetzmäßigkeiten. Die Ionen, welche durch den Stoffwechsel der Organismen frei werden, laden die Hydrogelteilchen in entsprechender Weise. Werden Wasserstoffionen in genügender Konzentration frei, so werden die Hydrogele positiv geladen, beim Freiwerden von Hydroxylionen werden sie elektrisch negativ geladen, und in diesem Zustande wirken sie dann auf die Goldteilchen ein. Diese aber sind in saurer, in neutraler und in alkalischer Lösung stets negativ geladen. Die positiv geladenen Membranteilchen haben dann die Fähigkeit, die Metallteilchen zu adsorbieren. Der Grad der Adsorbierbarkeit durch die Gelteilchen ist verschieden und wächst mit dem Säuregrad des Mediums (Tab. X). In neutral erscheinendem Medium kann die Umladung der Gele schon erfolgt sein, bevor die entsprechende Reaktion im Substrat nachzuweisen ist (Tab. XI). In deutlich alkalischem Medium findet nie Einlagerung statt (Tab. XIV). Da zur Einwirkung auf die Gele nur die minimalen Wasserstoffionenkonzentrationen zur Verfügung standen, die die Goldlösung erträgt, und die wahrscheinlich nicht immer genügen, die negative Ladung der Gelteilchen zur neutralisieren und diese umzuladen[3]), gelang es nicht bei allen Organismen, z. B. bei den Bakterien, Goldspeicherung herbeizuführen (Tab. XV). Vielleicht ist auch bei diesen die abweichende chemische Natur der

[1]) Hardy, Zeitschr. f. phys. Chemie 33. 1900. — Wo. Pauli, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 7. 1906. — Michaelis und Ehrenreich, Diese Zeitschr. 1908. — Rona und Michaelis, Diese Zeitschr. 1919.

[2]) Michaelis, Diese Zeitschr. 24, 30, 33, 47.

[3]) Vgl. die Kataphoreseversuche an Monilia und Hefezellen auf S. 52.

Digitized by Google

Membran für das Ausbleiben der Speicherung verantwortlich zu machen. Diese spielt möglicherweise auch beim Ausbleiben der Fixierung durch die höheren Pflanzen eine Rolle. Als Erklärung des Farbumschlags saurer Goldlösung beim Einlegen von Wurzelhaaren wurde das Vorhandensein geringer Proteidteilchen, die sich von den Würzelchen ablösen, herangezogen[1]). Diese laden sich in der sauren Lösung sofort positiv und rufen auf diese Weise den Umschlag hervor[2]). Eine Fixierung der Metallteilchen fand nie statt (Tab. III—V), wenn den Hydrosolen ein Eiweißstoff in ausreichender Menge als „Schutz" hinzugesetzt war. In dem System Wasser, Metall und zugesetztes Proteid verhält sich das Goldteilchen so, als wenn es ganz aus ihm bestände. Es ist nun in saurer Lösung wie die Gelteilchen positiv, in alkalischer ebenfalls negativ geladen und kann nicht fixiert werden (Tab. X).

Jedem positiv geladenen Hydrogelteilchen kommt die Fähigkeit zu, das negativ geladene Goldteilchen zu adsorbieren. Daher wird das Gold in der ganzen Breite der Membran fixiert. Auf die Begründung der Tatsache, daß die Goldteilchen die ganze Membran zu durchdringen vermögen, kann zur Zeit nicht näher eingegangen werden. Ebenso ist es vorläufig nicht möglich, eine Erklärung zu geben, warum die Färbung der Hyphen oft an einer Querwand plötzlich abbricht. Wahrscheinlich hängen diese Erscheinungen zusammen mit bestimmten Lebensfunktionen der Pilze, durch welche vielleicht auch die Möglichkeit der verhältnismäßig rasch eintretenden Vertiefung der Färbung in lebenden Hyphen bedingt wird. Durch die Fixierung immer neuer Goldteilchen entsteht um die Hyphen herum stets eine Veränderung in der gleichmäßigen Verteilung der „dispersen Phasen". Die Herbeischaffung neuer Goldteilchen erfolgt jedoch auch in der sehr verdünnten Lösung bei niederer Temperatur (Tab IX) so schnell, daß zu ihrer Erklärung der Faktor der Diffusion der Goldlösung nicht ausreichen dürfte.

Was die Goldanhäufung in den Nahrungsvakuolen der Paramaecien betrifft, so scheint mir für sie die gleiche Erklärung zutreffend. Wahrscheinlich wird bei diesen hochentwickelten

[1]) Vgl. S. 19.

[2]) Zsigmondy, Einige bemerkenswerte Eigenschaften des kolloidalen Goldes. Zeitschr. f. anorg. Chemie 96. 1916. — Gann, Kolloidchem. Beih. 8, 1916.

Digitized by Google

Protozoen dem Wasser entnommenen Nährstoffen gegenüber ein Wahlvermögen statthaben, derart, daß nur die in Körperflüssigkeit bestimmter, schwach saurer Reaktion löslichen Stoffe aufgenommen werden. Das Gold wird dann von den, durch die Ionen der Körperflüssigkeit positiv geladenen Teilchen der Umgebung der Vakuolen fixiert, und deshalb nicht mehr mit den unverdaulichen Stoffen aus dem Körper ausgeschieden. Es handelt sich also auch hier nicht um eine Koagulation des Goldes, denn Koagulationshäufchen würden, wie gesagt, mit den unbrauchbaren Teilen der Nahrung ausgeschieden werden.

Die Kataphoreseversuche.

Die meisten festen Stoffe bewegen sich, wenn man sie, in Wasser suspendiert, in ein Potentialgefälle bringt zum einen oder anderen Pol. Ebenso wie die festen verhalten sich die nur schwach quellbaren, die noch viele Eigenschaften der festen besitzen. Hierzu gehören die untersuchten Organismen. Es wurden daher Versuche angestellt, um die Natur der Ladung der Zellen in wässerigen Medien mit verschiedener Reaktion festzustellen.

In die unter dem Mikroskop in einem kleinen Troge aus Glas befindliche Flüssigkeit tauchten Platinelektroden ein. Abstand der Elektroden: 4 cm. Spannung: 30—50 Volt, Stromstärke: 1 Amp., Vergrößerung etwa 200. Bei Bakterien und Hefezellen genügte diese Vergrößerung nicht. Daher wurde das Substrat auf einen Objektträger gebracht, mit einem gestützten Deckglase bedeckt und durch Elektroden von Platinscheibchen mit dem Stromkreis verbunden. Vergrößerung: 500, Abstand der Elektroden $1^1/_2$ cm, Spannung: 8—10 Volt, Stromstärke: 1 Amp.

Es wurden junge, gut goldspeichernde Hyphen von Aspergillus nig. ziemlich weitgehend zerkleinert, jedoch so, daß die Mycelteilchen, in Nährlösung gebracht, kräftig wuchsen, das Mycel also in lebendem Zustande erhalten war. Dann wurde es in der Nährflüssigkeit, aus der die Überimpfung in Goldlösung vorgenommen wurde und Goldspeicherung ergab, im Potentialgefälle (Spannung 34 Volt) untersucht. Alle Mycelteilchen wanderten zur Kathode, waren also positiv geladen. Bei Umkehr des Stromes kehrte sich die Wanderungsrichtung ebenfalls um. Durch Erhitzen abgetötete Mycelteilchen verhielten sich ebenso. Ich nahm darauf von dem Aspergillusmycel aus der gleichen Nährlösung und legte es eine Zeitlang in je eine schwach alkalische wässerige Flüssigkeit von 0,25% und 0,4% Kaliumcarbonatgehalt. In diesen Substraten in den Stromkreis gebracht, wandern sämtliche Mycelteilchen gleichmäßig zur Anode. Die Wanderung kehrte sich um bei Umkehr des Stromes. Das Mycel erträgt die schwachen Alkaligrade; wird es durch Erhitzen abgetötet, so wandert es ebenfalls zur Anode.

Digitized by Google

Das gleiche Resultat ergaben sämtliche Organismen, die die Ammonnitratlösung deutlich sauer gemacht hatten: Aspergillus glaucus, alle Penicilliumarten, Citromyces und Botrytis. Sie alle zeigten in saurer Lösung kathodischen, in alkalischer Lösung anodischen Wanderungssinn. Sehr interessant war das Verhalten von Oidium lactis. Es bewegte sich in schwach alkalischer wässeriger Lösung kataphoretisch deutlich zur Anode. Wenn es eine Zeitlang in einer Lösung von dem gleichen Säuregrad, den das Goldhydrosol bei positiver Speicherungsreaktion von Oidium lactis hat, lag, so wanderte ein Teil der Hyphen und die meisten Sporen deutlich zur Kathode, die übrigen zeigten keine Wanderung. Ebenso verhielt sich Mucor muc., der in schwach alkalischen Lösungen zur Anode zog.

Bei Monilia var. war nie Speicherung des Mycels zu erzielen. Sie wurde aus der Ammonnitratlösung, in der sie, wenn auch ziemlich kümmerlich, wuchs, in eine wässerige Kaliumcarbonatlösung von 0,025% K^2CO_3-Gehalt gebracht. Der Alkaligehalt war derjenige, den die Goldlösung Au_4 ergeben hatte. Bei der Untersuchung im Potentialgefälle zeigte sie negative Ladung. Mycel aus der gleichen Kultur wurde dann in wässerige 0,045% proz. oxalsaure Lösung eingelegt, ein Säuregrad, den die Goldlösung, wie beschrieben, gerade noch aushält. Die kataphoretische Wanderung ist nicht deutlich, die meisten Hyphen liegen unbeweglich unter dem Mikroskop. Nach Zusatz einer größeren Oxalsäuremenge (0,08%), die die Goldlösung aber nicht mehr erträgt, geht sie zur Kathode. Ebenso zeigten die verschiedenen Hefen erst nach Zusatz größerer Oxalsäuremengen oder stärker dissoziierter Säuren (Schwefelsäure, Salzsäure 0,01%) kathodischen Wanderungssinn. In den vom Gold ertragenen Säuregraden ziehen sie zur Anode. Leider konnte ich nie einzelne Individuen beobachten, die zur Kathode wanderten. Wie erwähnt[1]), fanden sich immer einzelne Hefezellen, die Gold gespeichert hatten, also eine positive Ladung trugen, es gelang aber nicht, sie bei der Kataphorese herauszufinden.

Im übrigen sind diese Versuche eine erfreuliche Bestätigung für die Annahme der elektrisch verschiedenen Ladung der Pilzzellen, in erster Linie der Membranen, entsprechend der Reaktion in ihrer Umgebung und infolgedessen auch eine Erhärtung der Theorie der Metallspeicherung infolge elektrisch bedingter Adsorption.

Die Giftwirkung der Silber- und Kupferlösungen.

Es bleibt uns die kurze Beschreibung der zweiten auffälligen Beeinflussungen der niederen Organismen durch die angewandten kolloiden Metalle, die Beschreibung der Hemmungswirkungen, die in den Silber- und Kupferlösungen in so deutlicher Weise in die Erscheinung treten.

Wie wir sahen, wurden durch die kolloidale Goldlösung außer einer Herauszögerung der Fruktifikation keine anormalen Verhältnisse hervorgerufen.

[1]) Siehe S. 47.

Digitized by Google

Wir können also sagen: die Goldhydrosole haben den untersuchten Organismen gegenüber keine wesentliche Giftwirkung.

Ganz unbestreitbar sind aber die Hemmungswirkungen der kolloiden Silber- und Kupferlösungen.

Wie wir sahen (Tab. III—V), wird das Wachstum der Hyphen von Aspergillus, Penicillium und Mucor in allen Ein- und Vielzellkulturen in Silberlösungen auch in der großen Verdünnung von 0,003% Metallgehalt weitgehend zurückgehalten, nachdem der Keimungsbeginn um mehrere Tage verzögert wurde. Weitaus die meisten Sporen keimen überhaupt nicht und zeigen geringe oder gar keine Quellung, so daß sie anscheinend unverändert in den Lösungen liegen. Werden sie nach 3 Tagen in Nährsubstrat übertragen, so keimen sie nicht mehr aus. Die einzelnen Arten haben den Giftwirkungen der Lösungen gegenüber ungleiche Widerstandskraft. Aspergillus nig. wird am weitgehendsten zurückgehalten, der Beginn der Keimung verzögert sich in seinen Kulturen länger als bei Penicilliumarten, es keimen stets weniger Sporen überhaupt, und die Mycelschläuche bleiben sehr kurz. Von Verzweigung oder Querwandbildung ist wenig die Rede. Um ein geringes widerstandsfähiger ist der an sich kräftigere Mucor; sein Keimschlauch wird etwas länger, verkümmert aber auch bald. In den Kulturen mit mehreren Sporen liegen die Verhältnisse nicht viel anders. Aspergillus wird auch hier am stärksten beeinflußt; am wirksamsten scheint überall das Elektrokollargol zu sein.

In Ein- und Vielzellenkulturen von Mucor in verdünntem Silberhydrosol mit Nährlösungszusatz (Tab. V) kommt es stets zu reichlicher Bildung von Gemmen mit dicker Membran, in die sich das Plasma der Hyphen hineinrettet. Sporangienbildung wurde selten beobachtet. In der gleichen Lösung (Tab. V) fruktifiziert Aspergillus nie, Penicillium A dagegen fängt am 10.—12. Tage, also sehr verspätet, mit der Konidienabschnürung an. An den Konidienträgern sind die hemmenden Wirkungen der Silbersole wohl zu erkennen, sie sind weniger kräftig, als es der Art in gewöhnlicher Nährlösung gleicher Konzentration entspricht. Bei den in Tab. III und IV zusammengestellten Kulturen wurde nie Fruktifikation beobachtet.

Alle anderen Schimmelpilze verhalten sich in Lösungen mit 0,003% Silbergehalt in der gleichen Weise. Aspergillus glaucus wird ebenso weitgehend gehemmt wie Aspergillus nig., alle Penicilliumarten mit Einschluß von Citromyces kommen etwas besser vorwärts, zeigen aber alle deutlich die Spuren der Giftwirkung in der Verzögerung der beginnenden Keimung und Conidienabschnürung, in der Verkürzung des Mycels und der weniger kräftigen Ausbildung der Conidienträger.

Die chemisch hergestellte Silberlösung hat die geringste Hemmungswirkung, Elektrokollargol die größte, das Fulmargin steht etwa in der Mitte von beiden.

Etwas anders gestaltet sich die Entwicklung der Organismen, wenn der Metallgehalt der Lösungen ein ungleicher bleibt, die zur Verdünnung zugesetzte Nährlösungsmenge aber überall die gleiche ist.

Digitized by Google

In einer Verdünnung von 20 Teilen Ammonnitratlösung und 1 Teil Hydrosol kommen bei einigen Sporen von Aspergillus und Penicillium kurze Mycelschläuche zustande, die aber im Kollargol und Elektrokollargol sehr kurz und dünn bleiben und bald absterben. Bei Mucor kommt es zu längerer Hyphen- und Gemmenbildung. Die Membran der Hyphen verquillt sehr stark, derart, daß die Membrankontur undeutlich wird, und eine breite Zone von Gallerte erscheint, die beiderseits die Breite der eigentlichen Hyphe erreichen kann. In solchen Schläuchen erscheint das Plasma stark lichtbrechend; bei Färbung mit Anilinblau erweisen sie sich als tot. Einem Teil der Hyphen aber gelingt es immer, ihr Plasma in eine Gemme hineinzuretten, lebhafte Plasmaströmungen sind leicht zu beobachten. Die Gemmen besitzen eine dicke Membran von 1,8—2,5 μ Durchmesser. Sie liegen unverändert in der Lösung. Nach 4—5 Tagen in Nährlösung gebracht, keimt ein Teil von ihnen aus. — Im Fulmargin kommt es bei der Verdünnung Kolloid : Nährlösung = 1 : 20 auch bei Penicillium und Aspergillus zu längerer Hyphenbildung. Sehr bald stellt sich aber auch hier die eben beschriebene Verquellung der Membranen ein, eine Verlängerung findet dann nicht mehr statt. Dennoch ist zu erkennen, daß bei dieser Art der Verdünnung das Fulmargin, die Lösung mit dem geringsten Metallgehalt, die geringste Hemmungswirkung hat. Das Elektrokollargol hat auch hier die größte hemmende Kraft.

Gehen wir zu größeren Verdünnungen über, so ist der Unterschied in der Hemmungswirkung der drei verschiedenen Silberlösungen nicht mehr so klar zu erkennen.

Bei einer Verdünnung im Verhältnis: Kolloid : Nährlösung = 1: 400 sind auch einzeln ausgesäte Aspergillussporen bei einer Temperatur von 20—22° C nach 4 Tagen gut gekeimt. Die jungen Hyphen sind ganz mit Plasma gefüllt, Querwände und Verzweigungen sind normal ausgebildet, sonstige Abnormitäten sind nicht erkennbar. Vom 6. Tage an beginnt jedoch eine krankhafte Verzweigung der Hyphenenden. Diese teilen sich so oft, daß eine büschelförmige Anordnung zustande kommt. Neben dieser übergroßen Verzweigung tritt die Entwicklung von kugeligen Riesenzellen auf, die endständig und interkalar an Haupt- und Seitenhyphen erscheinen. Sie sind in der Größe verschieden bei einem Durchmesser von 18—25 μ und darüber, bis herunter auf 5—6 μ. Das Mycel, an dem sie sitzen, ist 3,6—7,2 μ breit, einige Hyphen erscheinen jedoch krankhaft verbreitert. Die Membran dieser Riesenzellen ist stark verdickt, 1,5—1,8 μ breit. Der größte Teil der Blasen ist ganz von körnigem Plasma erfüllt, einige aber enthalten einen mehr oder weniger breiten Plasmabelag und in der Mitte eine große Vakuole. Die Riesenzellen treten in Einzellkulturen, sowie in großer Menge in Reagensglaskulturen mit mehreren Sporen als Ausgangsmaterial auf. Solche enorm großen Zellen sind schon mehrfach an verschiedenen Pilzen beschrieben[1]) und auf verschiedene chemische Ursachen zurück-

[1]) Klebs, 1896, Die Bedingungen d. Fortpflanzung b. einigen Algen u. Pilzen. — Boas, Zeitschr. f. Bot. 1919, S. 153. — Raciborski 1896.

Digitized by Google

geführt worden. Die Aspergillusarten scheinen besonders dazu zu neigen, bei Penicillium traten sie in unseren Untersuchungen nie in gleicher Zahl und Größe auf. Die Membran der Blasen nimmt mit Chlorzinkjod eine leicht blaue Färbung an, scheint also Cellulose zu enthalten. Bei Einwirkung von Jod und Schwefelsäure färbt sie sich aber nicht blau, ebensowenig mit Jodalkohol. Schwefelsäure löst sie nicht auf. In der genannten Verdünnung kommt es bei Aspergillus vom 12.—14. Tage an zur Fruktifikation. Gestalt, Größe und Farbe der Sporen sind normal. Werden sie in Nährsubstrat ausgesät, so wächst und fruktifiziert das daraus entstehende Mycel in normaler Weise.

In größeren Verdünnungen treten die gleichen Erscheinungen auf, nur in entsprechend geringerem Grade, und die Conidienentwicklung wird weniger lange hinausgeschoben. Bei einer Verdünnung von Kolloid : Nährlösung = 1 : 5000 sah ich noch verhältnismäßig reichlich verdickte Zellen von 11—15 μ Durchmesser mit verdickter Membran interkalar und endständig. Bei Verdünnungen von 1 : 6000 waren sie nur sehr selten zu finden.

Ähnliche Erscheinungen zeigt Penicillium A. Bei Verdünnungen von 400 Teilen Ammonnitratlösung auf 1 Teil Elektrokollargol erscheinen an den Haupthyphen viele verkürzte und verdickte seitliche Ausstülpungen. Die übergroße Verzweigung der Hyphenenden greift auch hier Platz. Einige Hyphenenden zeigen keulenförmige Verdickung bis zu 11 μ am Ende der Hyphe. Die Sporen haben normale Gestalt und Größe und liefern nach Aussaat in gewöhnlicher Nährlösung normales Mycel. Bei einer Verdünnung von 1 : 5000 fruktifiziert der Pilz am 6.—7. Tage nach der Impfung bei einer Temperatur von 15—17° C. Die beschriebenen Verdickungen sind aber am Mycel noch ziemlich häufig bemerkbar. Bei einer Verdünnung von 1 : 7000 sah ich sie nicht mehr.

Bacillus megatherium und brassicae wurden ebenfalls in größeren Verdünnungen in Kulturen, die im hängenden Tropfen angelegt wurden, geprüft. Beide Spaltpilze keimen noch nicht bei 400facher Verdünnung von Elektrokollargol mit Hefewasser. Bei 1000facher Verdünnung keimen einige Sporen aus. Werden die jungen Stäbchen von Bac. megatherium in die Verdünnung : Elektrokollargol : Hefewasser = 1 : 40 000 gebracht, so zeigen sie die Einwirkung des Giftes durch beschleunigte Sporenbildung. Bac. Brassicae wird durch diese Verdünnung nicht mehr beeinflußt.

Wir kommen zu der Wirkung der kolloidalen Kupferlösung. Da die Konzentration des Metalls in ihr nicht bekannt war, so war es nicht möglich, die Kulturen aus der Kupferlösung in Vergleich zu setzen mit denen aus den Gold- und Silberlösungen; es erübrigt sich auch die Angabe der genauen Verdünnungsgrade, bei denen die bestimmten Reaktionen eintreten. Es genügt die Feststellung, daß die Wirkung des Kupfersols ebenfalls eine ausgesprochen hemmende ist. In ganz geringen Verdünnungen wurde die Keimung aller Organismen in Ein- und Vielzellkulturen unterdrückt. Bei

---

Flora 82. — Raciborski 1905, Bull. Acad. de sciences de Cracovie. Tanret 1896. Compt. rend. del Acad. **123**, 948, 1896. — Haenicke, Zeitschr. f. Bot. 8, 1916.

Digitized by Google

etwas größeren Zusätzen von Nährsubstrat traten bei Aspergillus, Penicillium und Mucor die besprochenen Quellungserscheinungen in markanter Weise auf, denen das Absterben der Hyphen folgte. Bei noch größerer Verdünnung zeigte sich auch hier bei Mucor übergroße Gemmenbildung. In gleichem Grade trat die Riesenzellbildung bei Aspergillus niger hervor, der im Kupfer noch reichlichere und und größere Zellen bildete als im Silbersol. Ebenso erschienen auch bei Penicillium die Verdickungen der Membran und des ganzen Mycels, sowie die übergroße Verzweigung der Hyphenenden.

Wenn wir diese Wachstumshemmungen überblicken, so tritt uns die Frage entgegen, durch welche Faktoren sie verursacht werden. Die außerordentlich großen hemmenden Wirkungen der kolloidalen Silberlösungen wurden auch schon auf andere Weise festgestellt. Friedenthal[1]) berichtet, daß nur das positive Wasserstoffion und die elektrisch hergestellte kolloidale Quecksilberlösung das Fulmargin an absoluter Desinfektionskraft übertreffen. Wie wir sahen, durchdringen aber die Metallteilchen die Plasmahaut der Zellen nicht, gelangen also nicht in das Innere der Zellen und können infolgedessen ihren Tod nicht veranlassen. Das entladene metallische Silberteilchen scheint überhaupt keine Giftwirkung zu besitzen. Die Membranen nämlich, die aus stark verdünnten Silberlösungen das Metall fixiert hatten, zeigten auch bei stärksten Vergrößerungen keinerlei Deformationen, wenn das Silber durch 2 proz. Cyankalilösung aus ihnen herausgelöst wurde. Niemals waren die für die Giftwirkung in unserem Fall so charakteristischen Quellungserscheinungen an ihnen zu erkennen, obgleich sie das Metall zum Teil in großer Menge gespeichert hatten Daß die Silberteilchen an sich nicht für die Giftwirkung verantwortlich zu machen sind, geht auch aus Untersuchungen, die von medizinischer Seite vorliegen, hervor. Das in das Blut injizierte Silber verschwindet aus ihm in ganz kurzer Zeit[2]) und lagert sich in Endothelzellen, z. B. der Leber ab. Dennoch ist es von großer Wirksamkeit bei Infektionen, die zum Teil hervorgerufen werden durch pathogene Organismen, deren Erreger sich in der Blutbahn befinden. Seine entgiftenden Wirkungen, die übrigens nicht allein auf der bactericiden Eigenschaft der Sole beruhen sollen, können also kaum an das Metallteilchen

[1]) Friedenthal, Diese Zeitschr. Oktober 1919.

[2]) Engelen gibt eine Zeit von 7 Minuten an. Ärztl. Rundsch. 1914, Nr. 20.

Digitized by Google

an sich gebunden sein. Wahrscheinlich ist die Wirkung dieser Silberlösungen zurückzuführen auf die Bildung von Silberionen[1]), wie das schon mehrfach betont worden ist.

Das für die Silberlösungen Gesagte, gilt auch für das kolloidale Kupfer.

Zusammenfassung.

Zum Schluß möchte ich die in der Arbeit gewonnenen Resultat zusammenfassen.

Bei der Einwirkung von Metallhydrosolen auf niedere Organismen sind zwei Erscheinungen von besonderem Interesse:

1. die Fixierung der Metallteilchen durch die Organismen, und
2. die wachstumshemmenden Wirkungen der Hydrosole.

Die Fixierung der kolloiden Metalle ist abhängig von dem Gehalt an organischen Kolloiden in den Hydrosolen.

Die von den Hydrosolen ausgeübten Hemmungswirkungen sind abhängig von der Art des kolloiden Metalls.

Bei Abwesenheit eines organischen Kolloids tritt Fixierung des Metalls durch die Membranen der Organismen ein.

Ist der Gehalt an organischem Kolloid groß genug, um die Metallteilchen dauernd vor der Einwirkung der Gele der niederen Organismen zu schützen, so findet keine Fixierung statt.

Bei einem Gehalt an organischem Kolloid, der nicht genügt, eine Fixierung vollständig zu verhindern, ist der Grad der Speicherung abhängig von der Menge des organischen Kolloids.

Die Goldlösungen enthalten kein organisches Schutzkolloid, daher tritt bei ihnen die Tatsache der Metallspeicherung besonders in die Erscheinung. Die Silber- und Kupferlösungen enthalten Schutzkolloide zum Teil in beträchtlicher Menge, daher werden ihre Teilchen in unverdünnten Lösungen von den Hydrogelteilchen nicht fixiert. Mit der Verdünnung der Lösungen wird auch der Grad des Schutzes verringert, und in genügend großen Verdünnungen findet auch in Silber- und Kupferlösungen Fixierung der Metallteilchen statt.

Die Speicherung tritt während des Lebens der Organismen ein. Die Membran nimmt die Färbung der Metallösungen an. Eine chemische Verbindung zwischen Membran und Metallteilchen

---

[1]) Zsigmondy, Kolloidchem. 2. Aufl. S. 190. — Friedenthal, Therap. d. Gegenw. 1918.

Digitized by Google

findet nicht statt, dieses bleibt in metallischem Zustande erhalten.

Durch gesteigerte Metallkonzentration werden an sich nicht einlagernde Organismen nicht zur Fixierung veranlaßt.

Alle beobachteten Organismen, die durch ihre Lebensfunktionen im Substrat saure Reaktion hervorrufen, speichern die Metalle in hervorragender Weise. Wird durch ihren Lebensprozeß in besonders gewählten Nährsubstraten alkalische Reaktion hervorgerufen, so bleibt die Speicherung aus. Alle Organismen, die durch ihr Wachstum ihr Nährsubstrat alkalisch machen, zeigen keine Fixierung. Wird die Reaktion der Metallhydrosole modifiziert, so tritt die Speicherung ein, resp. sie bleibt aus, je nach der Reaktion des Sols.

Die Speicherung ist ein Kondensationsvorgang und bedingt durch die elektrische Ladung der aufeinander einwirkenden Faktoren. Nur bei entgegengesetzter Ladung findet Aufnahme statt. Die Ladung der Membranteilchen der niederen Organismen ist abhängig von der Reaktion ihrer Umgebungsflüssigkeit (positiv bei saurer, negativ bei alkalischer Reaktion). Die Metallteilchen der unveränderten Goldsole tragen bei jeder Reaktion der Umgebungsflüssigkeit negative Ladung. Daher werden sie in einem Medium mit saurer Reaktion von den Hydrogelen fixiert, in alkalischer Lösung nicht gespeichert.

Die Umladung der Hydrogele wurde durch ihr Verhalten im Potentialgefälle bestätigt.

Wachstumshemmungen traten in kolloidalen Goldlösungen gar nicht in die Erscheinung.

Die Wachstumshemmungen waren sehr beträchtlich in kolloidalen Silber- und Kupferlösungen. In Lösungen von gleichem Prozentgehalt des Metalls haben die Kolloide mit den kleinsten Teilchen (Elektrokollargol und Fulmargin) die größte hemmende Wirkung. In Lösungen mit ungleichem Silbergehalt ist das Kolloid mit dem größten prozentualen Metallgehalt (Kollargol) demjenigen mit geringstem Metallgehalt (Fulmargin) überlegen.

Die Widerstandsfähigkeit der Organismen ist verschieden. Von den Schimmelpilzen werden Aspergillusarten am weitgehendsten beeinflußt. Bac. brassicae ist resistenter als Bac. megatherium.

Die Giftwirkungen äußern sich in der Hinauszögerung der Keimung und Conidienentwicklung, in Quellungen der Membranen

Digitized by Google

in der Bildung von Riesenzellen, in Verkrümmungen und Verdickungen des Mycels und der Membran, sowie in Modifikationen der Conidienträger.

Literatur.

Biltz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**. 1904. — Boas, Zeitschr. f. Bot. 1919, S. 153. — Bredig, Anorganische Fermente. Leipzig. 1900/01. — Czapek u. Kohn, Beobachtungen über Bildung von Säure und Alkali. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 8. 1906. — Gann, Zusammenhang zwischen chem. Konstitution d. organ. Verbindungen und ihre Fähigkeit... Kolloidchem. Beih. 8. 1916. — Hardy, Eine vorläufige Untersuchung der Bedingungen, welche die Stabilität der nicht umkehrbaren Hydrosolen bestimmen. Zeitschr. f. physiol. Chemie 1908. — Koch, Jahresbericht **4**, 268. 1893. — Kohlrausch u. Holborn, Leitvermögen der Elektrolyte. Leipzig und Berlin. 1906. — Kruse, Mikrobiologie. Leipzig 1910. — Lafar, Handbuch d. Mycologie. Jena 1904—07. — W. Ostwald, Grundriß d. Kolloidchemie. Dresden. 1909. — Pauli, Untersuchungen über physiol. Zustandsänderungen d. Kolloide. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **7**. 1906. — Raciborski, Über den Einfluß äußerer Bedingungen auf d. Wachstumsweise von Basidiobolus ranarmes. Flora 82. 1896. — Raciborski, Einige Chemomorphosen b. Asp. niger. Bull. acad. d. scienc. d. Cracovic. 1905. — Tauret, Action du nitrate d'ammoniaque-sur l'Asp. nig. Compt. rend. de l'Acad. Paris T. **123**, 948. 1896.

Digitized by Google

Physikalisch-chemische Untersuchungen an Körperflüssigkeiten.

Der Zustand des Chlors in Serum und Plasma. I.

Von

Stefan Rusznyák.

(Aus der III. mediz. Klinik Budapest.)

(Eingegangen am 15. Juni 1920.)

Den Ausgangspunkt nachstehender Untersuchungen bildet eine Mitteilung von Falta und Richter-Quittner[1]), aus welcher hervorzugehen scheint, daß während im Serum das gesamte NaCl sich in freiem Zustande befindet, im Plasma ein gewisser Teil hiervon — 10—20% — an Eiweiß, speziell an Fibrinogen gebunden ist. Sie bestimmen das „Gesamtchlor" nach der Methode von v. Korányi, bei welcher die organischen Bindungen zerstört werden und versuchen das freie Chlor durch Enteiweißung nach Royée-Frisch oder nach v. Hoesslin zu isolieren. Indem sie nun fanden, daß, während im Serum die Konzentration des freien Chlors mit jener des Gesamtchlors übereinstimmt, hingegen im Plasma die Menge des „freien" Chlors kleiner als die gesamte Chlormenge ist, halten sie die eingangs erwähnte Schlußfolgerung für gerechtfertigt. Nun ist es eine heikle Sache bei der Entscheidung, ob eine gewisse kolloide Bindung besteht oder nicht, eine Methode zu verwenden, welche eine derart grobe Zustandsänderung der betreffenden Kolloide verursacht, wie die Enteiweißung durch Ausfällung. Man ist dabei zwei entgegengesetzten Fehlern ausgesetzt; es kann vorkommen, daß bestehende Bindungen zerfallen oder im Gegenteil, daß neue Bindungen entstehen, d. h. in dem vorliegenden Falle freies Chlor an den Eiweißniederschlag adsorbiert wird.

[1]) Diese Zeitschr. **91**, 381.

Digitized by Google

Da es bekannt ist, in wie hohem Grade kolloidale Bindungen durch den Dispersitätsgrad beeinflußt werden, war es angezeigt die Frage mittels eines Verfahrens zu prüfen, bei welchem Zustandsänderungen der beteiligten Kolloide nicht auftreten. Eine solche Methode steht uns in der Ultrafiltration zur Verfügung.

Methodik.

Zur Untersuchung wurde meistens das Blut von verschiedenen hypertonischen Nierenkranken benützt, da in der benötigten Menge dieses am leichtesten zu beschaffen war. Bei der Gewinnung des Plasmas (durchweg Hirudinplasma) und des Serums, sowie bei der Bestimmung der Chloride nach v. Korányi (Ko.), Royée-Frisch (R.-F.) und v. Hoesslin (H.) hielt ich mich an die Vorschriften von Falta und Richter-Quittner. In einigen Fällen wurde das Chlor auch mit Hilfe der Mikromethode von Bang bestimmt. Zur Ultrafiltration benützte ich den bewährten Apparat von Bechhold. Ich arbeitete mit Kollodiumfiltern von $7^1/_2\%$ bei einem Oxygendruck von 10—12 Atm. Filtriert wurde gewöhnlich so lange, bis aus einer Plasma- resp. Serummenge von 30—60 ccm ein eiweißfreies Filtrat von 10 bis 15 ccm abgepreßt werden konnte. Der Gang einer Versuchsreihe war der folgende: Ein Teil des frischgewonnenen Plasmas oder Serums wurde im Ultrafiltrationsapparat filtriert; zuerst wurde gewöhnlich im eiweißfreien Filtrat die Chloridmenge nach Volhard bestimmt und sodann im Originalplasma resp. Serum mit Hilfe der v. Korányischen und einer der Ausfällungsmethoden. Ebenso wurde das Chlor in der eiweißreichen Flüssigkeit, welche auf dem Filter zurückblieb, bestimmt.

Es wurden in jedem Falle Parallelbestimmungen ausgeführt, welche immer gut miteinander übereinstimmten. Die weiter unten angeführten Zahlen sind die Mittelwerte aus den Parallelbestimmungen und bedeuten die Chlormengen in 100 ccm Flüssigkeit, als Natriumchlorid berechnet. Im ganzen stehen mir zehn Versuchsreihen zur Verfügung.

Versuchsergebnisse.

Es konnten zunächst die Befunde von Falta und Richter-Quittner bestätigt werden. Es ist Tatsache, daß im Serum die verschiedenen Methoden denselben Chlorgehalt ergeben,

Digitized by Google

während im Plasma durch die v. Koranyische Methode eine bedeutend höhere Konzentration gefunden wird als mit den Ausfällungsmethoden. Hierfür folgende Beispiele:

Fall Horn: Nephrosklerose.

	Ko.	R.-F.
Serum	0,588	0,590

Fall Toth: Nephrosklerose.

	Ko.	H.
Plasma	0,620	0,550

Bei der Ultrafiltration zeigte sich jedoch, daß das gesamte Chlor sowohl des Serums wie des Plasmas diffusibel ist und quantitativ durch das Filter hindurchgeht.

Fall Helle: Myodeg. cordis.

	von Plasma	von Serum
Ultrafiltrat . . .	0,591	0,585

Dieses Verhalten konnte auch dadurch verursacht sein, daß die evtl. im Plasma bestehende Eiweiß-Chlorid-Verbindung durch die Filtration gesprengt wird. Um diese Möglichkeit auszuschließen, mußten die Verhältnisse eingehender untersucht werden. Zunächst war auffallend, daß der Chlorgehalt des Ultrafiltrates den sog. Gesamtchlorgehalt des zugehörigen Plasmas oder Serums regelmäßig, wenn auch um ein geringes übertraf. Folgende Beispiele mögen das am besten illustrieren:

Fall	Substrat	Chlorgehalt
Helle	Plasma	0,573
	Filtrat	0,591
Toth	Plasma	0,620
	Filtrat	0,660
Bodó	Serum	0,513
	Filtrat	0,542
Kurucz	Serum	0,528
	Filtrat	0,566
Löwy	Serum	0,661
	Filtrat	0,664

Diese Erscheinung kann dadurch verursacht werden, daß die geringen Mengen von unzerstörten Kolloiden, welche bei der Methode nach v. Korányi immerhin in der Flüssigkeit zurückbleiben, bei der Titrierung einen Teil des Chlorgehaltes verdecken, während im gänzlich kolloidfreien Ultrafiltrat sich der wirkliche Chlorgehalt bestimmen läßt. Ich fand tatsächlich in speziell hierauf gerichteten Untersuchungen, daß bei der Steigerung der bei der nassen Veraschung angewendeten Menge von Kaliumpermanganat auch die Menge des titrierbaren Chlors merklich ansteigt, doch ist der im Ultrafiltrate gefundene Wert nur selten zu erreichen.

Der Wasserverlust durch Eintrocknung des Ultrafiltrates während der Filtration kann diese Erscheinung nicht erklären. Ich fand in einem

Digitized by Google

Fall, wo die Filtration bei Luftabschluß unter Paraffinöl vorgenommen wurde, einem NaCl-Gehalt von 0,594% im Serum und 0,642% im Ultrafiltrate. Dagegen spielt sicherlich der sog. „nichtlösende Raum" (s. Polányi, diese Zeitschr. **104**, 237) eine Rolle. Wenn man diesen Raum „p" nach der Formel,

$$p = \frac{(\Delta c_2 - \Delta c_1) \cdot 100}{\Delta c_1 \cdot f}$$

berechnet, wobei Δc_1 den Chlorgehalt des Serums, Δc_2 den Chlorgehalt des Dispersions mittels (Ultrafiltrat) und „f" den Eiweißgehalt des Serums (durchschnittlich 6%) bedeutet, so erhält man bei dem zuletzt erwähnten Versuch

$$p = \frac{(0{,}642 - 0{,}594) \cdot 100}{0{,}594 \cdot 6} = 1{,}3,$$

also eine Größe, welche gut mit den Resultaten Polányis übereinstimmt.

Die Frage, ob das Vorhandensein einer Eiweiß-Chlorid-Verbindung im Plasma durch die Befunde von Falta und Richter-Quittner bewiesen wird, wurde durch die Untersuchung der Flüssigkeit, welche bei der Ultrafiltration über dem Filter bleibt, in negativem Sinne entschieden. Wie schon erwähnt, erhält man für den Chlorgehalt des Plasmas verschiedene Werte, je nachdem man die Bestimmung nach der Methode von v. Korányi oder nach einer der Ausfällungsmethoden vornimmt. In diese letztere Gruppe gehört, wie ich mich öfters habe überzeugen können, außer den Methoden nach Reyée-Frisch und nach v. Hoesslin auch die Mikromethode nach Bang. In der restierenden Flüssigkeit, welche nach der Ultrafiltration über dem Filter bleibt (hier als „Rest" bezeichnet) ist nun die Differenz zwischen beiden Bestimmungsarten noch viel größer als im Originalplasma.

Fall Toth: Nephrosklerose.

	Ko.	H.
Plasma	0,620	0,550
Rest	0,621	0,500

„Rest" bedeutet hier die Flüssigkeit, welche nach Abpressung von 9 ccm Ultrafiltrat aus 50 ccm Plasma verblieb. Der wirkliche Chlorgehalt erweist sich mittels der v. Korányischen Methode als unverändert, während das „freie" Chlor eine bedeutende Verringerung zeigt.

Im Serum ergeben bekanntlich beide Bestimmungsarten denselben Chlorgehalt, wird jedoch das Serum ultrafiltriert, so zeigt sich in der Restflüssigkeit wiederum eine Differenz zugunsten der v. Korányischen Methode. Im folgenden Beispiel wurden aus 40 cm Serum 12 ccm Ultrafiltrat abgepreßt.

Fall Horn: Nephrosklerose.

	Ko.	R.-F.
Serum	0,588	0,590
Rest	0,540	0,354

Digitized by Google

Also zwischen beiden Werten bei Serum kein Unterschied, bei „Rest" dagegen ein ganz großer. Es wäre ganz ungerechtfertigt, in diesem Falle eine Chlorbindung anzunehmen. Aus diesem Beispiele ist aber noch etwas ersichtlich. Die Bestimmung des Chlorgehaltes im Originalserum und im Rest ergab nach der Methode von v. Korányi ebenfalls einen Unterschied, während im Falle „Toth" Plasma und Rest denselben Chlorgehalt aufweisen. Nun unterscheiden sich beide Fälle untereinander auch darin, daß im Falle „Toth" das Plasma durch die Filtration nur ca. $^1/_5$ seines Wassergehaltes (resp. Dispersionsmittels) verlor, während die Menge des Ultrafiltrates im Falle „Horn" mehr als $^1/_4$ des ursprünglichen Volumens betrug. Wurde die Ultrafiltration noch weiter fortgesetzt, so sank auch die durch die v. Korányische Methode nachweisbare Chlormenge beträchtlich, wie das aus folgendem Beispiel gut ersichtlich ist. In diesem Falle wurden aus 40 ccm Serum 15 ccm Ultrafiltrat abgepreßt, also $^3/_8$ der Originalmenge.

Fall Löwy: Nephrosklerose.

	Ko.
Serum	0,661
Rest	0,602

Die Ursache des Unterschiedes zwischen Plasma oder Serum und dem dazugehörigen Filtrationsrest kann nur in der Verschiedenheit des Eiweißgehaltes liegen. Aber dieser selbe Unterschied im Eiweißgehalte besteht, wenn auch nicht in so hohem Grade, zwischen Plasma und Serum, wodurch die Unterschiede bei der Chlorbestimmung eine einfache Erklärung finden. Wir haben gesehen, daß je höher der Eiweißgehalt der Lösung, um so größer war der Unterschied zwischen dem tatsächlichen und dem durch die Fällungsmethoden nachweisbaren Chlorgehalte. Ein Teil des Chlors wird eben durch den Eiweißniederschlag mitgerissen, was bei kleineren Eiweißmengen noch keinen Unterschied ausmachen muß, bei höheren Konzentrationen jedoch einen ansehnlichen Betrag erreichen kann.

Zusammenfassung.

Überblicken wir die kennengelernten Tatsachen, so ergibt sich folgendes: Die Angaben von Falta und Richter-Quittner über das verschiedene Verhalten von Serum und Plasma bei der Chlorbestimmung sind richtig. Tatsächlich ergeben bei Serum die verschiedenen Methoden denselben Chlorgehalt, während bei Plasma eine Differenz zugunsten der v. Korányischen Methode sich ergibt. Dieser Unterschied ist jedoch wie aus obigen Versuchen hervorgeht, nicht auf das Vorhandensein von gebundenen Chlor, sondern auf den größeren Eiweißgehalt des Plasmas zurückzuführen. Wird der Eiweißgehalt der Flüssigkeit durch Ultrafiltration künstlich erhöht, so läßt sich eine ähnliche Diskrepanz der Methoden auch bei Serum nachweisen.

Digitized by Google

Bei noch höherem, in der Natur nicht vorkommendem Eiweißgehalte versagt auch die v. Korányische Methode. Die Enteiweißung durch Ultrafiltration ist die einwandfreieste Methode zur Bestimmung des Chlors in eiweißhaltigen Lösungen, hat aber für die Praxis den großen Nachteil, daß sie relativ große Mengen von Substanz benötigt und daß bei der Berechnung der „nichtlösende Raum" berücksichtigt werden muß.

Über die quantitative Bestimmung von Chlor in Körperflüssigkeiten läßt sich also folgendes sagen: Die Ausfällungsmethoden (Reyée-Frisch, v. Hoesslin und Mikromethode nach Bang) ergeben nur dann richtige Werte, wenn der Eiweißgehalt der Lösung einen bestimmten Grad nicht überschreitet, bei höheren Werten, so z. B. schon im Plasma ergeben sie zu kleine Chlorwerte. Für praktische Zwecke ist die v. Korányische Methode allen anderen überlegen.

Der Beweis für das Vorhandensein von kolloidal gebundenem Chlor im Blute ist bisher noch nicht erbracht worden.

Digitized by Google

Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen.

Von

Otto Warburg und **Erwin Negelein.**

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 28. Juni 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

1. Neben einigen Bakterien und Schimmelpilzen sind es vor allem die autotrophen Pflanzen, die ihren Stickstoffbedarf aus Nitraten decken. Der Stickstoff der Salpetersäure geht hierbei in die Reduktionsstufe des Ammoniaks über, mit der Assimilation des Stickstoffs ist also, summarisch betrachtet, folgender Reduktionsvorgang verbunden:

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2 \qquad (1)$$

2. Als Schimper[1]) fand, daß der Nitratgehalt grüner Blätter nur bei Bestrahlung merklich abnahm, sprach er die Vermutung aus, die Nitratassimilation in grünen Pflanzen sei ein lichtchemischer Vorgang und als solcher der Kohlensäureassimilation an die Seite zu stellen. In der Form, in der sie geäußert wurde, hat diese Auffassung einer späteren Kritik nicht standgehalten. Die Stickstoffbilanzen, die Godlewski[2]) für dunkel und hell gezogene Weizenkeimlinge aufstellte, lassen keinen Zweifel daran, daß Nitrate auch im Dunkeln assimiliert werden können; allerdings war die Verwertung bei Bestrahlung eine bessere, Godlewski faßte daher seine Ergebnisse in dem heute allgemein angenommenen Satze zusammen, daß „das Licht auf die Verarbeitung der Nitrate — begünstigend einwirkt".

3. Die Fähigkeit, Nitrate oder Nitrogruppen zu reduzieren, ist nicht auf die nitratassimilierenden Organismen beschränkt.

---

[1]) Schimper, Botan. Ztg. **46**, 65. 1888.

[2]) Godlewski, Extrait Bull. Acad. Scient. Cracovie, Juin 1903.

Digitized by Google

Schönbein[1]) beobachtete, daß rote Blutkörperchen Nitrate in Nitrite überführen. Nach Neuberg und Welde[2]) verwandelt gärende Hefe Nitrobenzol in Anilin; als Zwischenstufen nimmt Neuberg Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin an, da auch diese Stoffe durch gärende Hefe zu Anilin reduziert werden[3]).

Organbreie und zellfreie Flüssigkeiten tierischer oder pflanzlicher Herkunft reagieren vielfach mit Nitratsauerstoff, wobei niedrigere Oxydationsstufen des Stickstoffs entstehen; man spricht in diesem Fall von „Reduktasen". In der Schardingerschen Milchprobe kann das Methylenblau nach Bach[4]) durch Nitrat vertreten werden, an Stelle von Methylenweiß bildet sich dann Nitrit.-

Als Zwischenstufe der Nitratreduktion betrachtet B. Moore[5]) salpetrige Säure und vermutet, daß diese in bestrahlten grünen Blättern entsteht; er stützt sich dabei auf die bekannte Tatsache, daß kurzwellige Strahlung Nitrat in Nitrit und Sauerstoff spaltet[6]).

4. In nitratassimilierenden Zellen tritt normalerweise die Reduktion der Salpetersäure gegen die Oxydation der Brennstoffe völlig zurück und konnte deshalb nie direkt gemessen werden. Durch einen einfachen Kunstgriff gelang es, die Geschwindigkeit der Nitratreduktion so zu steigern, daß sie der Geschwindigkeit der übrigen Zellvorgänge gleichkam oder diese sogar übertraf. Als Versuchsobjekt diente eine kleine isoliert wachsende Grünalge, Chlorella pyrenoidea Chick. aus dem Formenkreis der Chlorella vulgaris Beyerink[7]). Bringt man diese Alge in konzentriertere Nitratlösungen oder in Lösungen verdünnter freier Salpetersäure, so beobachtet man keine oder nur eine unbedeutende Beschleunigung der Nitratreduktion. Da undissoziierte Säuremoleküle im Gegensatz zu Salzen und Ionen vielfach schnell in lebende Zellen eindringen, lag es nahe, weitere Versuche mit höheren

---

[1]) Schönbein, Journ. f. prakt. Chemie **84**, 193. 1861.

[2]) Neuberg und Welde, diese Zeitschr. **60**, 472. 1914.

[3]) Neuberg und Welde, diese Zeitschr. **67**, 18. 1914; vgl. auch Lipschütz, W., Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chemie **109**, 189. 1920.

[4]) Diese Zeitschr. **31**, 443. 1911; **33**, 282. 1911.

[5]) Moore, Proc. Roy. Soc. London, Serie B. **90**, 158. 1918.

[6]) z. B. Warburg, E., Sitzungsber. d. Preuß. Akad. d. Wiss. Physik.-mathem. Klasse 1918, S. 1228.

[7]) Herrn Dr. v. Wettstein sage ich auch hier für die Bestimmung der Alge vielen Dank.

Digitized by Google

Konzentrationen an undissoziierter Salpetersäure anzustellen, also mit Gemischen von Salpetersäure und Nitrat. Wurde die Alge in derartige Gemische eingebracht, so stieg die Geschwindigkeit der Nitratreduktion zu außerordentlich hohen Beträgen an, indem sie im Dunkeln durchschnittlich 70%, bei Bestrahlung 200% des Gesamtstoffwechsels ausmachte, in beiden Fällen mithin ohne Schwierigkeiten direkt gemessen werden konnte. Hierbei blieb die Alge etwa 10 Stunden unverändert grün und teilungsfähig.

Die Wiedergabe der Versuche zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Versuchsanordnung.
II. Meßmethoden. Messung des Gaswechsels a) durch Analyse, b) nach der Druckmethode. Bestimmung des Ammoniaks. Bestimmung der salpetrigen Säure.
III. Extra-Kohlensäure.
IV. Ammoniak und Extra-Kohlensäure. Die Gleichung der Nitratreduktion. Reduktion und Assimilation des Salpetersäure-Stickstoffs.
V. Trennung der Nitratreduktion von Atmung und Assimilation mittels Blausäure.
VI. Thermodynamik der Nitratreduktion.
VII. Narkose und Nitratreduktion.
VIII. Einfluß der Sauerstoffkonzentration. Salpetrige Säure und Ammoniak.
IX. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.
X. Mechanismus der Lichtwirkung.
XI. Protokolle.

I. Versuchsanordnung.

Die Alge wurde, wie früher beschrieben[1]), unter Bestrahlung mit einer Metallfadenlampe gezüchtet. Die Aussaat betrug etwa 0,1 ccm an frischer Zellsubstanz (entsprechend 20 mg Trockensubstanz) auf 200 ccm Knopsche Lösung. Nach 2 Tagen, wenn sich die Zellmenge auf etwa das Vierfache vermehrt hatte, wurde das Material für die Versuche benutzt; ältere Kulturen — besonders solche, in denen die Algen schon sedimentiert waren — sind für die Versuche weniger geeignet.

Die Kulturflüssigkeit wurde zunächst unter mehrmaligem Waschen auf der Zentrifuge durch $^{n}/_{10}$-Natriumnitratlösung

[1]) Diese Zeitschr. **100**, 232. 1919.

Digitized by Google

ersetzt und eine neutrale Stammsuspension hergestellt, die 0,2—0,4 ccm Zellsubstanz auf 10 ccm enthielt. Zur Messung der Nitratreduktion wurde 1 Volumen dieser Stammsuspension mit 1 Volumen $^n/_{10}$-$NaNO_3$-, $^n/_{50}$-HNO_3-Lösung vermischt, so daß die Zellen dann — bei einer Suspensionsdichte von 0,1—0,2 ccm auf 10 ccm — in einer $^n/_{10}$-$NaNO_3$-, $^n/_{100}$-HNO_3-Lösung suspendiert waren. Die Konzentration an undissoziierter Salpetersäure in diesem Gemisch, im folgenden kurz als „Nitratgemisch" bezeichnet, berechnet sich[1]) zu ungefähr $6 \cdot 10^{-4}$ Molen pro Liter und ist etwa 9 mal so groß, wie in einer $^n/_{100}$-HNO_3-Lösung ohne Nitratzusatz. 10 ccm einer derartigen Suspension wurden mit Luft oder anderen Gasmischungen einige Zeit geschüttelt und aus den Veränderungen des Gasraums, die analytisch oder manometrisch festgestellt wurden, Sauerstoff- und Kohlensäurewechsel berechnet, dann zentrifugiert und in den überstehenden Flüssigkeiten die Reduktionsprodukte der Salpetersäure bestimmt.

Die Mengen an Stoffen, die hierbei auftraten oder verschwanden, waren von der Größenordnung 10^{-6} bis 10^{-5} Mole. Für Druckmessungen bedeuten derartige Mengen sehr erhebliche Ausschläge; denken wir uns, daß aus einem Raum von 10 ccm $5 \cdot 10^{-6}$ Mole eines Gases verschwinden, so zeigt ein angeschlossenes Wassermanometer bei Zimmertemperatur eine Druckänderung von rund 100 mm.

II. Meß-Methoden.

Messung des Gaswechsels durch Analyse. Wenn auch das früher beschriebene Druckverfahren[2]) einfacher und deshalb zur Auffindung neuer Tatsachen geeigneter ist, so muß die Gasanalyse doch als die Standardmethode betrachtet werden; sie ist unentbehrlich, solange die chemische Natur der im Gaswechsel entstehenden und verschwindenden Stoffe nicht bekannt ist.

Zu den gasanalytischen Versuchen diente ein beiderseitig mit Schwanzhähnen versehener flacher Rezipient (diese Zeitschr. **100**, 250, Abb. 7), dessen etwa 20 ccm fassender Rauminhalt zur Hälfte mit Zellsuspension gefüllt wurde. Bei geöffneten Hähnen in einen Wasserthermostaten versenkt, wurde eine Gasmischung bekannter Zusammensetzung durchgeleitet, bis sich die Flüssig-

[1]) Bogdan, Zeitschr. f. Elektrochemie **12**, 489. 1916.

[2]) Diese Zeitschr. **100**, 230. 1919.

Digitized by Google

keit mit dieser ins Gleichgewicht gesetzt hatte; dann wurden die Hähne geschlossen und der bei Schluß der Hähne herrschende Atmosphärendruck notiert. Der Rezipient wurde im Thermostaten (diese Zeitschr. 100, 250, Abb. 8) eine passende Zeit, verdunkelt oder bestrahlt, geschüttelt und dann durch Schliff mit dem Meßrohr eines Haldaneschen Analysenapparats verbunden; in dieses wurde ein Teil der im Gasraum enthaltenen Gase übergeführt, wobei eine Entgasung der Flüssigkeit leicht vermieden werden konnte. Der Prozentgehalt an Sauerstoff und Kohlensäure wurde nach bekannten Methoden ermittelt.

Die Berechnung des Gaswechsels gestaltet sich folgendermaßen. Es sei:

P der Gesamtdruck im Rezipienten bei Beginn des Versuchs in mm Hg,

P' der Gesamtdruck im Rezipienten bei Beendigung des Versuchs in mm Hg,

T die Thermostatentemperatur in absoluter Zählung,

p der Sättigungsdruck des Wasserdampfes bei T Grad in mm Hg,

α_{O_2} der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs in der Suspensionsflüssigkeit bei T Grad,

α_{CO_2} der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure in der Suspensionsflüssigkeit bei T Grad,

v_F das Volumen der eingefüllten Zellsuspension in ccm,

v_G das Volumen des Gasraums in ccm,

$b_{O_2} b_{CO_2} b_{N_2}$ der Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 vor dem Versuch,

$b'_{O_2} b'_{CO_2} b'_{N_2}$ der Prozentgehalt der Gasmischung an O_2, CO_2 und N_2 nach dem Versuch,

x_{O_2} die entstandene Menge Sauerstoff in ccm (0°, 760 mm Hg),

x_{CO_2} die entstandene Menge Kohlensäure in ccm (0°, 760 mm Hg).

Dann ist:

$$x_{O_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}\right)\left(\frac{P' - p}{760} \frac{b'_{O_2}}{100} - \frac{P - p}{760} \frac{b_{O_2}}{100}\right). \quad (2)$$

$$x_{CO_2} = \left(v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}\right)\left(\frac{P' - p}{760} \frac{b'_{CO_2}}{100} - \frac{P - p}{760} \frac{b_{CO_2}}{100}\right). \quad (3)$$

Digitized by Google

Der Gesamtdruck P' nach dem Versuch läßt sich aus dem Resultat der Gasanalyse in einfacher Weise berechnen. Da Stickstoff von der Alge weder gebunden noch entwickelt wird, bleibt der Partialdruck des Stickstoffs während des Versuchs konstant. Ergibt die Analyse gleichwohl eine Änderung des Prozentgehalts an Stickstoff, so muß sich der Gesamtdruck geändert haben und es gilt:

$$(P - p)\frac{b_{N_2}}{100} = (P' - p)\frac{b'_{N_2}}{100},$$

$$P' - p = (P - p)\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}}. \qquad (4)$$

Aus (4), (3) und (2):

$$x_{O_2} = \left[v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}\right] \frac{P - p}{760 \cdot 100} \left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} b'_{O_2} - b_{O_2}\right) \qquad (5)$$

$$x_{CO_2} = \left[v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{CO_2}\right] \frac{P - p}{760 \cdot 100} \left(\frac{b_{N_2}}{b'_{N_2}} b'_{CO_2} - b_{CO_2}\right). \qquad (6)$$

Die eckig eingeklammerten Ausdrücke sind für verschiedene Versuche konstant, wenn man mit denselben Gas- und Flüssigkeitsräumen und bei derselben Temperatur arbeitet (in den Protokollen als „Gefäßkonstanten" mit K_{O_2} und K_{CO_2} bezeichnet).

Der Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs wurde für 25° in allen Fällen = 0,028 gesetzt; der Absorptionskoeffizient der Kohlensäure bei der gleichen Temperatur = 0,75, wenn die Suspensionsflüssigkeit $^1/_{10}$ molar war, = 0,76, wenn sich die Zellen in der etwa $^1/_{50}$ molaren Knopschen Lösung befanden[1]).

Die in das Meßrohr des Haldane-Apparates übergeführte Gasmenge betrug im Mittel 7 ccm, die Änderung des Kohlensäure- oder Sauerstoffgehalts in dieser Gasmenge während eines Versuchs 0,2 ccm, während als Fehler einer Analyse 0,01 ccm = einer halben Einheit der Meßrohrteilung zu betrachten ist. Im Mittel wurde also der Gaswechsel auf 5% bestimmt, d. h. mit einer für unsere Zwecke völlig ausreichenden Genauigkeit.

Messung des Gaswechsels nach der Druckmethode. 2 Gefäße, Nr. I und II, wurden mit je 10 ccm Zellsuspension (S in der Abb. 1) beschickt. In den Einsatz (E) von Nr. I wurde 5 proz. Kalilauge gegeben, der Einsatz von Nr. II blieb leer.

[1]) Über die Änderung der Absorptionskoeffizienten mit der Salzkonzentration vgl. Geffcken, Zeitschr. f. physikal. Chemie 49, 257. 1904.

Digitized by Google

Beide Gefäße wurden darauf durch den Schliff F mit Haldane-Barcroftschen Blutgasmanometern verbunden und in einem Wasserthermostaten, bestrahlt oder verdunkelt, wie früher (diese Zeitschr. 100, 245, Abb. 2) beschrieben, geschüttelt. Die Druckmessung geschah bei konstantem Volumen, indem der Meniscus der Sperrflüssigkeit vor jeder Ablesung auf dieselbe Marke eingestellt wurde. Die mit den Gefäßen I und II verbundenen Manometer zeigten hierbei verschiedene Druckänderungen, die im ersten Fall, wenn der Gasraum durch Kalilauge frei von Kohlensäure gehalten wird, = der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks, im zweiten Fall = der Änderung des Sauerstoffpartialdrucks + der Änderung des Kohlensäurepartialdrucks sind.

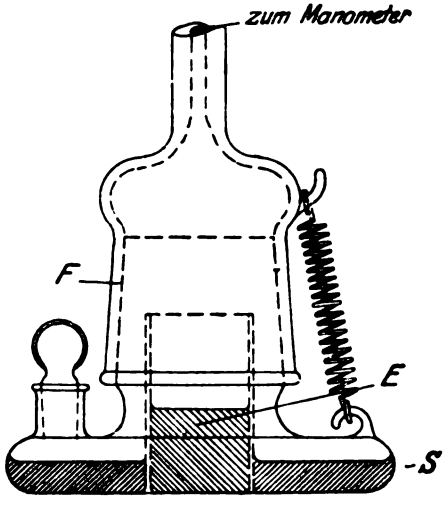


Abb. 1.

Zur Berechnung des Gaswechsels bezeichnen wir mit:

v_F das Volumen der eingefüllten Zellsuspension in ccm,

v_G das Volumen des Gasraums bis zum Ansatz der Manometercapillare in ccm,

v_M das Volumen der Manometercapillare bis zum Meniscus der Sperrflüssigkeit in ccm,

T die Temperatur des Thermostaten in absoluter Zählung,

α_{O_2} den Absorptionskoeffizienten des Sauerstoffs bei T Grad,

α_{CO_2} den Absorptionskoeffizienten der Kohlensäure bei T Grad,

h_{O_2}, h_{CO_2} die Zunahmen des Sauerstoff- oder Kohlensäurepartialdrucks in mm Brodiescher Flüssigkeit,

H_I, H_{II} die beobachteten Druckzunahmen für die Gefäße I und II in mm Brodiescher Flüssigkeit,

x_{O_2}, x_{CO_2} die entstandenen Mengen Sauerstoff und Kohlensäure in cmm (0,760 mm).

Digitized by Google

Für Gefäß I ist:

$$h_{CO_2} = 0\,; \quad H_I = h_{O_2}\,,$$

also (vgl. auch diese Zeitschr. 100, 242, Formel 7):

$$x_{O_2} = H_I \left[\frac{v_G + v_M}{v_G} \, \frac{v_G \frac{273}{T} + v_F \alpha_{O_2}}{10} \right]. \tag{7}$$

Für Gefäß II ist, indem wir alle Größen, die sich auf Gefäß II beziehen, mit einem Index versehen:

$$x'_{O_2} = \frac{v'_G + v'_M}{v'_G} h'_{O_2} \frac{v'_G \frac{273}{T} + v'_F \alpha_{O_2}}{10} \tag{8}$$

$$x'_{CO_2} = \frac{v'_G + v'_M}{v'_G} h'_{CO_2} \frac{v'_G \frac{273}{T} + v'_F \alpha_{CO_2}}{10} \tag{9}$$

$$H_{II} = h'_{O_2} + h'_{CO_2}\,. \tag{10}$$

Berücksichtigen wir, daß $x'_{O_2} = x_{O_2}$, da in beiden Gefäßen gleiche Mengen an Sauerstoff verschwinden, so enthalten die drei Gleichungen 8, 9 und 10 noch 3 Unbekannte; aufgelöst nach x'_{CO_2} erhalten wir:

$$x'_{CO_2} = H_{II} \left[\frac{v'_G + v'_M}{v'_G} \, \frac{v'_G \frac{273}{T} + v'_F \alpha_{CO_2}}{10} \right] - x_{O_2} \left[\frac{v'_G \frac{273}{T} + v'_F \alpha_{CO_2}}{v'_G \frac{273}{T} + v'_F \alpha_{O_2}} \right] \tag{11}$$

Arbeitet man mit denselben Flüssigkeitsmengen und bei derselben Temperatur, so sind für ein bestimmtes Gefäß die eckig eingeklammerten Ausdrücke konstante Größen (in den Protokollen als „Gefäßkonstanten" bezeichnet, und zwar bei Rechnung nach Gleichung (11) der Faktor für H_{II} mit „Gefäßkonstante 1, der Faktor für x_{O_2} mit „Gefäßkonstante" 2), die man sich notiert. Die Berechnung des Sauerstoff- und Kohlensäurewechsels ist dann außerordentlich einfach. Voraussetzung der Methode ist, daß außer Sauerstoff und Kohlensäure Gase weder entstehen noch verschwinden. Gasanalysen zeigten, daß diese Voraussetzung zutrifft und daß insbesondere bei der Reduktion der Sal-

Digitized by Google

petersäure kein Stickstoff in Freiheit gesetzt wird (Protokolle 15 und 34).

Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode. Zur Kontrolle der Druckmethode wurde der Gaswechsel grüner Zellen unter verschiedenen Bedingungen gleichzeitig nach beiden Verfahren gemessen, wobei gut übereinstimmende Werte gefunden wurden. Als Beispiel führen wir zwei Versuche an; Suspensionsflüssigkeit war im ersten Fall reines Nitratgemisch, im zweiten Fall Nitratgemisch mit Phenylurethan (Protokolle 1 und 2).

Versuch:		Sauerstoffverbrauch	Kohlensäureproduktion	CO_2/O_2
1	Gasanalyse	0,35 ccm	0,56 ccm	1,6
	Druckmethode	0,36 ccm	0,56 ccm	1,56
2	Gasanalyse	0,37 ccm	0,47 ccm	1,27
	Druckmethode	0,39 ccm	0,50 ccm	1,28

Die größte Differenz zwischen den nach beiden Verfahren erhaltenen Werten beträgt hier 6%, wobei zu berücksichtigen ist, daß in dieser Zahl auch die bei der Abmessung der Zellen entstehenden Fehler inbegriffen sind.

Messung der Ammoniakausscheidung. 1 ccm Gas (0,760 mm) ist gleich $45 \cdot 10^{-6}$ Grammolekülen. Die Ausschläge bei den Gaswechselmessungen waren von der Größenordnung 0,1 ccm Gas $= 4{,}5 \cdot 10^{-6}$ Grammoleküle. Da es darauf ankam, die Ammoniakausscheidung in Beziehung zum Gaswechsel zu setzen, so mußten beide Größen in derselben Zellsuspension bestimmt werden, die zu messenden Ammoniakmengen lagen also in der Größenordnung von Milliontel Grammolekülen.

Zur Bestimmung diente die colorimetrische Methode nach Nessler. Eine Zellsuspension, deren Gaswechsel gemessen war, wurde aus den Gefäßen (Abb. 1) quantitativ in Zentrifugiergläser übergespült, sofort scharf zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. 10 ccm wurden dann mit 0,5 ccm von Nesslers Reagens in einem Standzylinder gemischt und derselbe Farbenton in einem zweiten Standzylinder durch Verdünnung einer $^n/_{500}$-Ammonchloridlösung (1 ccm $= 2 \cdot 10^{-6}$ Grammoleküle Ammoniak) hergestellt. Ein Teil der Ammoniakbestimmungen wurde nicht direkt, sondern nach Übertreiben des Ammoniaks in eine $^n/_{50}$-HCl-Lösung

Digitized by Google

ausgeführt; hierzu wurde die Flüssigkeit mit 1 g Natriumchlorid und 2 ccm einer normalen Kaliumcarbonatlösung versetzt und das in Freiheit gesetzte Ammoniak bei 25° durch einen kräftigen Luftstrom nach der Vorschrift Folins[1]) in die Vorlage übergetrieben. Diese kompliziertere Art der Ammoniakbestimmung liefert im allgemeinen dieselben Resultate, wie die direkte Bestimmung. Wenn jedoch die Zellen geschädigt werden, wie bei niedrigen Sauerstoffdrucken, so treten Stoffe in die Außenflüssigkeit über, die die Nesslersche Reaktion stören. In solchen Fällen ist die direkte Bestimmung nicht möglich, die Anwendung des Folinschen Verfahrens unumgänglich.

Auch die salpetrige Säure wurde colorimetrisch bestimmt, und zwar mittels α-Naphtylamin-Sulfanilsäure nach Ilosvay[2]). Nach Beendigung der Gaswechselmessung wurde sofort scharf zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit, je nach den besonderen Bedingungen, auf das 10- bis 100fache verdünnt und das Ilosvaysche Reagens hinzugefügt.

III. Extra-Kohlensäure (Dunkelversuche).

Wird die Alge in luftgesättigter Knopscher Lösung suspendiert, so scheidet sie auf ein Volumen veratmeten Sauerstoffs ein Volumen Kohlensäure aus. An diesem Verhältnis ändert sich im allgemeinen nichts, wenn wir die Knopsche Lösung durch andere Flüssigkeiten ersetzen (Tabelle I).

Tabelle I.

Suspensionsflüssigkeit	$CO_2 : O_2$	Nr. des Protokolls
Knop	1,00	6
$^n/_{10}$-KH_2PO_4	1,03	5
$^n/_{10}$-$NaNO_3$	1,01	3
$^n/_{10}$-Na_2SO_4, $^n/_{100}$-H_2SO_4	1,04	4

Die Abweichungen von 1 fallen in die Fehlergrenzen der Messungen.

Bringen wir die Alge in das Nitratgemisch, so steigt der Sauerstoffverbrauch um etwa 40% an (Protokoll 7). Ein derartiger Anstieg ist nicht auffallend, er wird vielfach in Flüssigkeiten

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **37**, 161. 1902/03. Abderhaldens Biochem. Arbeitsmethoden **7**, 715. 1913.

[2]) Treadwell, Quantitat. Analyse 1913, S. 291.

Digitized by Google

beobachtet, die permeierende Substanzen, wie Narkotika, Amine, Fettsäuren, Blausäure usw. enthalten (vgl. diese Zeitschr. 100, 230, Abschn. VII). Bemerkenswert dagegen ist, daß die Kohlensäureproduktion stärker wächst als der Sauerstoffverbrauch. In dem Nitratgemisch — und von allen untersuchten Flüssigkeiten nur in diesem — steigt der Quotient $CO_2 : O_2$ bedeutend an, im Mittel auf etwa 1,5 (Protokolle 1, 8, 9, 10 und 11). Unter einigen hundert Messungen war der niedrigste Quotient, der gefunden wurde, 1,3, der höchste 2,0, wenn die Zellen jungen Kulturen entstammten.

Es läßt sich zeigen, daß in dem Nitratgemisch Kohlensäure zweierlei Herkunft ausgeschieden wird, nämlich erstens Atmungskohlensäure, deren Menge genau dem Sauerstoffverbrauch entspricht, und zweitens Kohlensäure, die bei der Reduktion der Salpetersäure entsteht. Die letztere nennen wir Extra-Kohlensäure, ihre Größe ist gegeben durch die Differenz der Ausscheidungen an Gesamtkohlensäure und Atmungskohlensäure.

Die Ausscheidung an Extra-CO_2 beginnt sofort, nachdem die Zellen in das Nitratgemisch eingebracht sind, und wird dann allmählich im Lauf von Stunden geringer (Tabelle II, nach Protokoll 14).

Tabelle II.

	$CO_2 : O_2$	Extra-CO_2 cmm
1. Stunde	1,6	156
2. Stunde	1,6	139
3. Stunde	1,4	87
4. Stunde	1,3	58
5. Stunde	1,2	27

Betrachten wir als Maß des normalen Stoffwechsels den Sauerstoffverbrauch in Knopscher Lösung, setzen diesen gleich 1 und vergleichen die verschwindenden und entstehenden Stoffe nach Molen, so ist in dem Nitratgemisch der Sauerstoffverbrauch gleich 1,4, die Ausscheidung an Gesamtkohlensäure gleich 2,1, die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure gleich 0,7, das ist 70% des normalen Stoffwechsels. Der Stoffwechsel der Alge erleidet also in dem Nitratgemisch eine tiefgreifende Veränderung; diese wird viele Stunden ohne Schädigung ertragen, die Zelle bleibt unverändert grün und teilungsfähig.

Digitized by Google

IV. Ammoniak und Extra-Kohlensäure (Dunkelversuche).

Gleichzeitig mit der Extra-Kohlensäure scheiden die Algen ein Reduktionsprodukt der Salpetersäure aus, Ammoniak. Suspendiert man 30 mg Algen (bezogen auf Trockensubstanz) in 10 ccm Nitratgemisch und schüttelt einige Stunden mit Luft oder Sauerstoff, so findet man die Suspensionsflüssigkeit etwa $^1/_{1000}$ normal in bezug auf Ammonnitrat.

Ammoniak und Extra-Kohlensäure erscheinen also zusammen und beide in keiner anderen Flüssigkeit als dem Salpetersäure-Nitratgemisch. Sie sind als Endprodukte eines Vorgangs zu betrachten, in dem die Salpetersäure reduziert wird. Über die relativen Mengen, in denen beide Stoffe ausgeschieden werden, geben Versuche Aufschluß, in denen Ammoniak und Extra-Kohlensäure gleichzeitig für ein und dieselbe Zellsuspension gemessen wurde.

Tabelle III.

Versuch	Zeit	Extra-CO_2 Milliontel Mole	NH_3 Milliontel Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1 (Protokoll 12)	1. Stunde	12	1	0,17
	2. Stunde	11	3	0,55
	3. u. 4. Stde.	13	6	0,86
2 (Protokoll 13)	1. Stunde	7,2	1,2	0,33
	2. Stunde	6,8	1,2	0,35
	3. Stunde	4,5	2,4	1,1
3 (Protokoll 14)	1. Stunde	7	0,9	0,26
	2. Stunde	6,3	1,3	0,41
	3. Stunde	3,9	1,8	0,92

Tabelle III zeigt, daß die Ausscheidung an Extra-CO_2 mit der Zeit abnimmt, die Ausscheidung an Ammoniak mit der Zeit zunimmt, bis in der dritten Stunde auf 2 Moleküle Extra-CO_2 etwa 1 Molekül Ammoniak erscheint. In dieser Periode ist der Vorgang folgendermaßen zu formulieren:

$$HNO_3 + H_2O + 2\,C = NH_3 + 2\,CO_2 \qquad (12)$$

wobei unter C nicht Kohlenstoff zu verstehen ist, sondern eine organische Verbindung von der Reduktionsstufe des Kohlenstoffs.

Was die früheren Perioden anbetrifft, so fragte es sich, ob anfänglich Ammoniak als solches in der Zelle zurückgehalten wird,

Digitized by Google

etwa durch Adsorption oder Bindung an Säuren. Zur Prüfung wurden die Zellen, nachdem sie einige Stunden in dem Nitratgemisch mit Luft geschüttelt waren, abzentrifugiert und die Sedimente mit $^n/_2$-Salpetersäure zerstört. Nach Übersättigung mit Kaliumcarbonat wurde dann, der Vorschrift von Folin folgend, mit einer Säurevorlage verbunden und bei 25° Luft durchgeblasen. In die Vorlage gingen hierbei nur Spuren von Ammoniak über. Hieraus ist zu schließen, daß in Betracht kommende Mengen von NH_3 oder NH_4^+ in der Zelle nicht zurückgehalten werden.

Weitere Versuche betrafen die Frage, ob die Reduktion in den ersten Stunden andere Wege gehe und Endprodukte, wie salpetrige Säure, Stickoxydul oder freier Stickstoff aufträten. Salpetrige Säure ließ sich in den von Zellen abgetrennten Zentrifugaten mittels der empfindlichen Diazoreaktion nicht nachweisen. Stickoxydul war nach den Gasanalysen auszuschließen; denn die Absorption in der Kalilaugepipette war stets nach einmaligem Übertreiben beendigt, während sich die Anwesenheit von Stickoxydul durch eine allmähliche Absorption in der großen Flüssigkeitsmenge hätte verraten müssen. Um auf Stickstoff zu prüfen, wurde die Nitratreduktion in fast reinem (99,8proz.) Sauerstoff vorgenommen; nach 2 Stunden wurde das Gas in den Analysenapparat übergeführt, in dem sich eine bekannte Menge Stickstoff befand. Kalilauge und Hydrosulfit absorbierten hierbei das eingeführte Gas ebenso vollständig, wie den zum Versuch verwendeten Sauerstoff; der Gasrest hatte also während der Reduktion nicht zugenommen. Beispielsweise betrug der Gasrest vor und nach einem Versuch (Protokoll 15) 0,02 ccm, war somit sicher um weniger als 0,01 ccm vermehrt, während 0,25 ccm Stickstoff hätten entstehen müssen, wenn die Reduktion vorwiegend nach der Gleichung

$$2\,N_2O_5 + 5\,C = 2\,N_2 + 5\,CO_2 \qquad (13)$$

verlaufen wäre.

Es scheint also, daß als einziges Endprodukt der Reduktion Ammoniak von der Zelle abgegeben wird, jedoch zunächst in geringeren Mengen, als nach der Produktion an Extra-Kohlensäure zu erwarten wäre. Die Auffassung liegt nahe, daß das in den ersten Stunden entstehende Ammoniak teilweise von der Zelle zum Aufbau ihrer Leibessubstanz zurückgehalten, d. h. assimiliert wird, und daß erst nachdem die Zelle mit Stick-

Digitized by Google

stoff gesättigt ist, alles neugebildete Ammoniak an die Außenflüssigkeit abgegeben wird. Wir hätten dann zu unterscheiden die Perioden der Assimilation, in der die Salpetersäure reduziert und das Reduktionsprodukt zum Aufbau verwertet wird, und die Periode der reinen Reduktion, in der eine Verwertung nicht mehr stattfindet.

Diese Auffassung wird gestützt durch Versuche mit stickstoffarmen Zellen, die man sich durch Bestrahlung in nitratfreien Lösungen verschaffen kann. Als stickstofffreie Lösungen dienten $^n/_{10}$-$NaHCO_3$ oder Knopsche Flüssigkeit, deren Nitrate durch Chloride ersetzt waren. In derartigen Lösungen kann Kohlensäure tagelang lebhaft assimiliert werden; bei konstanter Stickstoffmenge und wachsendem Gesamtgewicht tritt dann eine Verarmung an Stickstoff ein. Als stickstoffreiche Zellen bezeichnen wir solche, die in einer nitratreichen Flüssigkeit bestrahlt waren.

Um vergleichbares Material an beiden Zellarten zu gewinnen, wurde eine normale Kultur in 2 Teile geteilt; der eine Teil wurde mit einer nitrathaltigen, der andere Teil mit einer nitratfreien Lösung auf der Zentrifuge mehrmals gewaschen, beide Teile wurden unter Durchlüftung mit kohlensäurehaltiger Luft etwa 20 Stunden bestrahlt und dann, jeder Teil gesondert, in das Nitratgemisch eingebracht.

Tabelle IV.

Versuch		$CO_2 : O_2$	NH_3 Millionteil Mole	Mole NH_3 : 2 Molen Extra-CO_2
1 (Protokoll 16)	Stickstoffreiche Zellen	1,6	2	0,5
	Stickstoffarme Zellen .	1,6	0	—
2 (Protokoll 17)	Stickstoffreiche Zellen	1,8	3,6	0,5
	Stickstoffarme Zellen .	1,7	0	—

In Tabelle IV sind die Resultate von 2 Versuchen zusammengestellt, die Versuchszeiten überschritten nicht 2 Stunden, lagen also innerhalb der Periode des „Ammoniakdefizits". Die stickstoffreichen Zellen verhalten sich, wie oben beschrieben; mit der Extra-Kohlensäure erscheint reichlich Ammoniak, jedoch weniger als nach Gleichung 12 zu erwarten wäre. Die stickstoffarmen Zellen scheiden, relativ zum Sauerstoffverbrauch, die

Digitized by Google

gleichen Mengen Extra-Kohlensäure aus, wie die stickstoffreichen Zellen, die Quotienten $CO_2 : O_2$ sind für beide Zellarten nicht sehr verschieden; in bezug auf die Ammoniakausscheidung jedoch ergibt sich ein qualitativer Unterschied, die stickstoffarmen Zellen geben keine nachweisbaren Mengen Ammoniak an die umgebende Flüssigkeit ab.

Das Ammoniakdefizit ist also um so größer, je stickstoffärmer die Zellen sind oder, wie wir auch sagen können, je größer ihr Stickstoffbedarf. Wir schließen daraus auf eine Assimilation des Ammoniaks als Ursache des Defizits und nehmen an, daß in dem Nitratgemisch der Stickstoff der Salpetersäure zunächst nicht nur reduziert, sondern auch assimiliert wird. Ist dieser Schluß richtig, so ergibt sich die Möglichkeit, die Assimilation der Nitrate, geradeso wie ihre Reduktion, direkt zu messen und ihre Beeinflussung durch Bestrahlung, Narkotika, Blausäure usw. zu untersuchen, ein weites Feld für spätere Versuche.

Im Zusammenhang dieser Arbeit allerdings bedeutet die Assimilation eine unerwünschte Komplikation, nicht nur, weil dabei ein Endprodukt der Reduktion verschwindet und so der Messung entzogen wird, sondern auch aus folgendem Grunde: Entsteht bei der Assimilation beispielsweise Amidocapronsäure, so können wir, analog Gleichung 12, schreiben:

$$C_6H_{12}O_6 + HNO_3 + 3{,}5\ C = C_6H_{13}NO_2 + 3{,}5\ CO_2\,. \qquad (14)$$

Es bildet sich also pro Mol reduzierter Salpetersäure mehr Extra-Kohlensäure als bei der reinen Reduktion; solange wir die Endprodukte der Assimilation nicht kennen, darf die Menge des reduzierten Nitrats nicht aus der Extra-Kohlensäure berechnet werden. Eine solche Berechnung wird erst in der Periode der reinen Reduktion zulässig; hier entspricht der Bildung von zwei Molekülen Extra-Kohlensäure die Reduktion von einem Molekül Salpetersäure (Gleichung 12).

V. Trennung der Nitratreduktion von der Atmung und Kohlensäureassimilation mittels Blausäure (Dunkelversuche).

Wie früher beschrieben[1]), lassen sich Sauerstoffatmung und Kohlensäureassimilation der Alge mittels Blausäure trennen, und zwar ist die Kohlensäureassimilation von beiden Vorgängen

[1]) Diese Zeitschr. **190**, 264. 1919. **103**, 199 1920.

Digitized by Google

der empfindlichere. Zur Hemmung der Kohlensäureassimilation um 50% ist eine $4 \cdot 10^{-5}$ normale, zur Hemmung der Sauerstoffatmung um den gleichen Betrag eine 10^{-1} normale Blausäurelösung erforderlich.

Ähnlich liegen die Verhältnisse, wenn wir die Algen der gleichzeitigen Wirkung von Salpetersäure und Blausäure aussetzen, indem wir sie in blausäurehaltigen Nitratgemischen suspendieren. Nach Tabelle V ist hier zur Hemmung der Kohlensäureassimilation um 20% eine 10^{-5} normale Blausäurelösung erforderlich, zur Hemmung der Sauerstoffatmung um den gleichen Betrag eine 10^{-2} normale Blausäurelösung, d. h. die tausendfache Konzentration.

Tabelle V.

HCN Mole pro Liter	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	Protokoll-Nr.
Hemmung der Sauerstoffatmung . .			1,5%	13%	26%	18
Hemmung d. Kohlensäureassimilation		19%				19

Noch empfindlicher als die Kohlensäureassimilation ist die Nitratreduktion. Eine 10^{-6} normale Blausäurelösung hemmt die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure und Ammoniak um 60—80%, eine 10^{-5} normale Blausäurelösung um etwa 95% (Tabellen VI und VII). Die Nitratreduktion ist somit 20 mal

Tabelle VI.

Versuch	HCN-Mole pro Liter	O_2-Verbrauch cmm	CO_2-Produktion cmm	Extra-CO_2 cmm	Extra-CO_2 10^{-6} Mole	NH_3 10^{-6} Mole
1 (Protokoll 20)	0	228	387	159	7,2	1,8
	10^{-6}	249	314	65	2,9	0,28
	10^{-5}	215	227	12	0,5	0
2 (Protokoll 21)	0	360	637	277	12,6	2,6
	10^{-6}	353	363	10	0,45	0,1

Tabelle VII.

Versuch	HCN-Mole pro Liter	10^{-6}	10^{-5}
1	Hemmung der Ausscheidung an Extra-CO_2	59%	92%
	Hemmung der Ausscheidung an NH_3 . .	83%	96%
2	Hemmung der Ausscheidung an Extra-CO_2		96%
	Hemmung der Ausscheidung an NH_3 . .		96%

Digitized by Google

empfindlicher als die Kohlensäureassimilation und 20 000 mal empfindlicher als die Sauerstoffatmung.

In der Nitratreduktion verbrennt Kohlenstoff durch gebundenen Sauerstoff, in der Atmung verbrennt Kohlenstoff durch freien Sauerstoff. Die Tatsache, daß gleichwohl eine glatte Trennung beider Vorgänge mittels Blausäure möglich ist, zeigt, daß beiden Vorgängen durchaus verschiedene Mechanismen zugrunde liegen.

Theorie[1]). Die spezifische Beeinflussung der Lebensvorgänge durch Blausäure beruht darauf, daß sie Schwermetalle aus einer katalytischen wirksamen Form in katalytisch unwirksame komplexe Cyanide überführt. Blausäure wirkt in sehr kleinen Mengen, weil die in der Zelle wirksamen Schwermetallmengen sehr kleine sind.

Die Richtigkeit dieser Theorie vorausgesetzt, spielen also auch bei der Nitratreduktion, wie bei vielen anderen Lebensvorgängen, Schwermetallspuren eine Rolle.

VI. Thermodynamik der Nitratreduktion.

Oxydieren wir Ammoniak in saurer Lösung zu Salpetersäure, so verläuft der Vorgang nach folgender Gleichung:

$$NH_4^+ + 2\,O_2 = NO_3^- + H_2O + 2\,H^+ . \qquad (15)$$

Bezeichnen wir mit A die maximale Arbeit, die hierbei gewonnen wird, so ist

$$A = RT \ln \frac{NH_4^+ \cdot (p_{O_2})^2}{NO_3^- (H^+)^2} - RT \ln K . \qquad (16)$$

Die Änderungen der freien Energie für die Übergänge der verschiedenen Oxydationsstufen des Stickstoffs ineinander sind vor kurzem von H. Pick[2]) berechnet und die hierbei erhaltenen Werte in Form einer Potentialtabelle zusammengestellt. Aus dieser Tabelle ergibt sich für den Übergang $NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$ die Änderung der freien Energie zu + 65 500 cal., wenn die Konzentration der gelösten Reaktionsteilnehmer 1 Mol pro Liter, der Druck der gasförmigen Reaktionsteilnehmer 1 Atmosphäre ist. Setzen wir diesen Wert in Gleichung 16 ein, so ist ($T_{absol.} = 298°$)

$$A_{cal.} = RT \ln \frac{NH_4^+ \cdot (p_{O_2})^2}{NO_3^- \cdot (H^+)^2} + 65\,500 . \qquad (17)$$

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **92**, 231. 1914.

[2]) Zeitschr. f. Elektrochemie **26**, 182. 1920.

Digitized by Google

Lassen wir die Oxydation in unserem Nitratgemisch unter Schütteln mit Luft vor sich gehen, so ist einzusetzen für

$$p_{O_2} = 0 \cdot 2 ; \quad NO_3^- = 10^{-1} ; \quad H^+ = 10^{-2} .$$

Die NH_4^+-Konzentration ändert sich während der Oxydation, ihr mittlerer Wert liegt in unserer Anordnung bei $0{,}5 \cdot 10^{-3}$. Legen wir diesen Wert zugrunde, so wird ($T_{absol.} = 298°$)

$$A_{cal.} = 2740 + 65500 = 68240 .$$

Um also unter unseren Versuchsbedingungen Salpetersäure zu Ammoniak zu reduzieren, müssen rund 68 000 cal Arbeit zugeführt werden. Diese Arbeit könnte durch die Sauerstoffatmung geliefert werden; wahrscheinlich war dies von vornherein nicht, da die Atmungsarbeit eine wenn auch noch zumeist unbekannte Bestimmung in der Zelle hat und nicht anzunehmen ist, daß diese Arbeit, wenn die Zellen in das Nitratgemisch eingebracht werden, zu einem großen Teil ihrer früheren Bestimmung entzogen werden kann.

In der Tat wird die zur Reduktion erforderliche Arbeit nicht durch die Sauerstoffatmung geliefert, sondern durch einen mit der Reduktion gekoppelten Vorgang, in welchem Sauerstoff der Salpetersäure und Sauerstoff des Wassers sich mit Kohlenstoff organischer Verbindungen zu Kohlensäure vereinigt.

Um die Änderung der freien Energie für diesen gekoppelten Vorgang zu berechnen, denken wir ihn in zwei Phasen verlaufend. In der ersten Phase bilde sich Sauerstoff von $^1/_5$ Atmosphärendruck nach der Gleichung:

$$NO_3^- + H_2O + 2H^+ = NH_4^+ + 2O_2 - 68000 \text{ cal.} \qquad (18)$$

In der zweiten Phase reagiere dieser Sauerstoff mit dem Kohlenstoff eines Kohlenhydrats nach der Gleichung:

$$2O_2 + 2C = 2CO_2 + 2 \cdot 115000 \text{ cal.} \qquad (19)$$

Die Zahl 115 000 cal. ist für $^1/_6$ Mol Traubenzucker nach der Nernstschen Näherungsformel in derselben Weise berechnet, wie der Wert von Pollitzer (98 000 cal.) für die Verbrennung von amorphem Kohlenstoff. Addieren wir die Gleichungen (18) und (19), so erhalten wir für den Gesamtvorgang:

$$NO_3^- + H_2O + 2H^+ + 2C = NH_4^+ + 2CO_2 + 162000 \text{ cal.} \qquad (20)$$

Unter den Bedingungen unserer Versuche werden also bei der Nitratreduktion rund 160 000 cal. Arbeit frei, oder, wie wir auch

Digitized by Google

sagen können, nutzlos entwickelt, während 68 000 cal. Arbeit in Form chemischer Energie der Zelle erhalten bleiben.

Es berechnet sich so für die Nitratreduktion ein Nutzeffekt von etwa 30%.

VII. Narkose und Nitratreduktion (Dunkelversuche).

Bringt man die Algen in Nitratgemische, denen mittlere Konzentrationen eines Narkoticums zugesetzt sind, so gehen sie in einigen Stunden unter Braunfärbung zugrunde; werden die braunen Zellen abzentrifugiert, so findet man in den überstehenden Flüssigkeiten reichliche Mengen salpetriger[1]) Säure. An Phenylurethan genügt eine Konzentration von 0,026 g in 100 ccm = $1{,}6 \cdot 10^{-3}$ Molen pro Liter, um diese Wirkung hervorzubringen, während höhere Konzentrationen in Knopscher Lösung oder Carbonatgemischen unter sonst gleichen Bedingungen[2]) unschädlich sind.

Es war deshalb nicht möglich, die Wirkung der Narkotica auf die Nitratreduktion in einem ähnlich weiten Konzentrationsbereich zu prüfen, wie früher[2]) die Wirkung auf Atmung oder Kohlensäureassimilation. Immerhin haben Versuche mit Phenylurethan ein bemerkenswertes Resultat ergeben.

Die höchste Konzentration an Phenylurethan, die in mehrstündigen Versuchen ohne Schädigung angewendet werden kann, ist 0,013% = $0{,}8 \cdot 10^{-3}$ Mole pro Liter Nitratgemisch. Diese Konzentration hemmt die Kohlensäureassimilation fast völlig, die Bildung an Extra-Kohlensäure jedoch nur um etwa 30%. Wir können uns also mittels Phenylurethan Zellen verschaffen, die zwar Salpetersäure noch lebhaft reduzieren, Kohlensäure jedoch nicht mehr photochemisch zerlegen. Bestrahlungsversuche mit derartigen Zellen waren entscheidend für die Frage, in welcher Weise das Licht die Nitratreduktion beeinflußt (Kapitel X).

Einige Resultate für Zellen in Nitratgemisch ohne Narkoticum und mit 0,013% Narkoticum sind in Tabelle VIII zusammengestellt.

Die Atmung war in allen Fällen etwas beschleunigt. Beschleunigung der Atmung bewirkt, auch wenn die Ausscheidung an Extra-Kohlensäure unverändert ist, ein Sinken

[1]) Vgl. hierzu das folgende Kapitel.

[2]) Diese Zeitschr. **100**, 265. 1919, und **103**, 196. 1920.

Digitized by Google

Tabelle VIII.

Versuch	Lösung	$CO_2 : O_2$	Extra-CO_2 cmm	Hemmung der Ausscheidungen an Extra-CO_2
1 (Protokoll 22)	ohne Phenylurethan .	1,5	82	33%
	0,013% Phenylurethan	1,3	55	
2 (Protokoll 23)	ohne Phenylurethan .	1,5	99	27%
	0,013% Phenylurethan	1,3	72	
3 (Protokoll 24)	ohne Phenylurethan .	1,6	210	30%
	0,013% Phenylurethan	1,35	150	

des Quotienten $CO_2 : O_2$; die Änderung dieses Quotienten ist deshalb hier kein Maß für die Hemmung Extra-CO_2-Ausscheidung.

Wird durch eine bestimmte Konzentration Phenylurethan die Atmung beschleunigt, die Nitratreduktion ein wenig gehemmt, die Kohlensäureassimilation völlig gehemmt, so können wir unser Resultat dahin zusammenfassen, daß die Nitratreduktion, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen Narkotica, zwischen Atmung und Kohlensäureassimilation steht.

VIII. Einfluß der Sauerstoffkonzentration (Dunkelversuche).

a) In den bisher beschriebenen Versuchen entsprach die Sauerstoffkonzentration der Nitratgemische der Sättigungskonzentration für $^1/_5$ Atmosphäre Sauerstoffdruck; der Gasraum der Schüttelgefäße war mit Luft gefüllt und änderte seine Zusammensetzung während der Versuche nur unwesentlich. Die Zellen blieben hierbei, wie erwähnt, lange Zeit unverändert grün und teilungsfähig.

Füllt man jedoch den Gasraum der Schüttelgefäße mit Mischungen niedrigen Sauerstoffpartialdrucks oder bringt man die Suspensionen in gasdicht verschlossene Zylinder, so werden die Zellen bald hellgrün und schließlich braun. In anderen Flüssigkeiten — der Knopschen Lösung, einer neutralen Natriumnitratlösung, einer verdünnten Schwefelsäurelösung — wird eine derartige Wirkung des Sauerstoffmangels nicht beobachtet. Freie Salpetersäure zerstört also bei Sauerstoffmangel das Chlorophyll.

Schon bevor die Zellen ihre Farbe ändern, sind sie tot, nicht mehr teilungsfähig und nicht mehr imstande, Kohlensäure zu

Digitized by Google

assimilieren. Der zeitliche Verlauf der Schädigung läßt sich in einfacher Weise verfolgen, indem man Proben ein- und derselben Zellsuspension verschiedene Zeiten dem Sauerstoffmangel aussetzt und dann unter normalen Bedingungen die Maximalgeschwindigkeit der Kohlensäureassimilation mißt. Bei dem in Tabelle IX wiedergegebenen Versuch wurde die Zerstörung des Chlorophylls nach etwa 2 Stunden sichtbar, während das Assimilationsvermögen schon nach $^1/_2$ Stunde deutlich herabgesetzt, nach $1^1/_2$ Stunden fast völlig verschwunden war.

Tabelle IX (Protokoll 25).

0,1 ccm Zellen in 10 ccm Nitratgemisch.

	Nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr von			
	0′	30′	60′	90′
Maximale Assimilation in 15′ (cmm zersetzte CO_2)	60	48	18	5

b) Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen erscheint neben Ammoniak ein zweites Reduktionsprodukt der Salpetersäure, die salpetrige Säure. Nitratgemische, in denen Algen kurze Zeit unter Sauerstoffmangel suspendiert waren, geben mit dem Diazoreagens beim Erwärmen tiefrote Färbungen. 0,1 ccm Algen, in 10 ccm Nitratgemisch suspendiert, scheiden hierbei pro Stunde soviel salpetrige Säure aus, daß die umgebende Flüssigkeit in bezug auf HNO_2 10^{-5} bis 10^{-4} normal wird (Protokoll 26).

c) Die giftige Wirkung des Sauerstoffmangels ist nichts anderes als eine Nitritvergiftung: In einem Nitratgemisch, dem 10^{-5} Mole salpetrige Säure pro Liter zugesetzt sind und das mit Luft oder Sauerstoff geschüttelt wird, gehen die Algen unter denselben Erscheinungen, Verblassung und Braunfärbung, zugrunde, wie bei Sauerstoffmangel in anfänglich nitritfreiem Nitratgemisch.

d) Die Nitritbildung wird durch Blausäure nicht gehemmt. Bringt man gleiche Mengen grüner Zellen in gleiche Mengen blausäurehaltiger und blausäurefreier Nitratgemische und beobachtet bei unterbrochener Sauerstoffzufuhr den zeitlichen Verlauf der Verfärbung, so ist kein Unterschied wahrzunehmen. Da die Ammoniakbildung durch Blausäure völlig gehemmt wird (Kapitel V), so ist zu schließen, daß der Reduktion zu Nitrit

Digitized by Google

und der Reduktion zu Ammoniak verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Offenbar ist nur die Reduktion zu Ammoniak ein physiologischer Vorgang.

e) Die Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel ist herabgesetzt (Tabelle X) um so mehr, je länger der Sauerstoffmangel einwirkt (Versuch 2 der Tabelle) oder je weiter die Nitritvergiftung vorgeschritten ist. Durch Nitrit abgetötete Zellen sind nicht mehr imstande, Salpetersäure zu Ammoniak zu reduzieren, bei der Empfindlichkeit dieses Reduktionsvorgangs ein zu erwartendes Resultat.

Tabelle X.

0,1 ccm Zellen auf 10 ccm Nitratgemisch.

Versuch	Sauerstoffdruck in Atmosphären	Zeit	Ammoniakausscheidung in Milliontel Molen
1 (Protokoll 27)	0,01	4 Stunden	0,08
	0,21	4 Stunden	3,2
2 (Protokoll 28)	0,01	1. Stunde	0,2
		2. Stunde	0
	0,21	1. Stunde	1,0
		2. Stunde	3,0

Wichtiger ist die Frage, ob Sauerstoffmangel auf die Ammoniakausscheidung schon wirkt, ehe die Zellen durch Nitrit vergiftet sind. Leider läßt sich die Ammoniakausscheidung völlig intakter Zellen, nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr, nicht messen, da die Nitritvergiftung schnell einsetzt. Immerhin ist der Vergiftungsgrad nach 30 Minuten (vgl. Tabelle IX) nur etwa 20%, so daß sich irreversible Folgen der Vergiftung in kurzdauernden Versuchen relativ wenig bemerkbar machen werden.

In Tabelle XI ist das Resultat eines 30 Minuten dauernden Versuchs zusammengestellt, in dem die ausgeschiedenen Mengen an Ammoniak und salpetriger Säure[1]), sowie die gleichzeitig veratmeten Sauerstoffmengen gemessen wurden.

[1]) Bei Zimmertemperatur und den niedrigen Konzentrationen an salpetriger Säure und Ammoniak wirken beide Stoffe nicht aufeinander, so daß die ausgeschiedenen Mengen nebeneinander bestimmt werden können.

Digitized by Google

Tabelle XI (Protokoll 29).

0,1 ccm Zellen in 10 ccm Nitratgemisch.

Im Gleichgewicht mit Sauerstoff von	Veratmeter O_2 Millionstel Mole	Ausgeschiedenes NH_3 Millionstel Mole	Ausgeschiedene HNO_2 Millionstel Mole
0,01 Atmosphären	1,8	0,34	0,26
0,017 „	2,4	0,46	0,20
0,055 „	4,5	0,9	0,04
0,21 „	4,9	1,0	0

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß sich alle drei Größen in einem Gebiet niedrigen Sauerstoffdrucks erheblich ändern; und zwar wird um so mehr salpetrige Säure, um so weniger Ammoniak ausgeschieden, je geringer der Sauerstoffdruck.

f) Theorie. Sinken des Sauerstoffverbrauchs und Bildung von Nitrit sind Erscheinungen, die gleichzeitig bei Verminderung des Sauerstoffdrucks auftreten. Wir schließen daraus, daß ein Sauerstoffatom der Salpetersäure veratmet werden kann wie freier Sauerstoff. Die Veratmung dieses Sauerstoffatoms tritt zurück, wenn die Konzentration an freiem Sauerstoff eine hohe ist, sie wird merklich, wenn der Sauerstoffdruck unter 0,05 Atmosphären sinkt.

Der Einfluß des Sauerstoffdrucks auf die Ammoniakbildung ergibt sich dann aus der einfachen Annahme, daß die in die Zelle eindringende Salpetersäure sofort reduziert wird[1]). Unter solchen Bedingungen ist die Geschwindigkeit der Nitratreduktion bestimmt durch die Menge Salpetersäure, die in einer gegebenen Zeit in die Zelle eindringt, oder die Summe an beiden Reduktionsprodukten, $NH_3 + HNO_2$, ist konstant. Vermindern wir den Sauerstoffdruck, so wird das zweite Glied der konstanten Summe größer, das erste also kleiner.

[1]) Trocknet man die Algen durch Überblasen eines Luftstroms bei Zimmertemperatur und nimmt sie wieder in Knopscher Lösung auf, so sind sie unverändert, was Form und Farbe anbetrifft; doch ist ihre Grenzschicht zerstört, wie man auf vielfache Weise zeigen kann. Bringt man derartige vorbehandelte Algen in das Nitratgemisch und schüttelt mit Sauerstoff, so färben sie sich in etwa 10 Minuten braun. Der Versuch zeigt, daß in dem Nitratgemisch zwischen dem Innern der lebenden Zelle und der umgebenden Flüssigkeit kein Ausgleich der Konzentrationen stattfindet.

Digitized by Google

Bildlich gesprochen, gibt es für den Strom der in die Zelle eindringenden Salpetersäure zwei Kanäle; in dem ersten erfolgt Reduktion zu Ammoniak, in dem zweiten zu Nitrit. Sinkt der Sauerstoffdruck, so hebt sich die Schleuse des zweiten Kanals und der Strom in dem ersten wird langsamer.

Für diese Auffassung spricht, daß bei Verminderung des Sauerstoffdrucks die Nitritausscheidung, der Größenordnung nach, um den gleichen Betrag steigt, als die Ammoniakausscheidung fällt (Tabelle XI). Eine genauere Übereinstimmung ist nicht zu erwarten, da wir die ausgeschiedenen, nicht die gebildeten Mengen der beiden Reduktionsprodukte messen.

IX. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.

a) Extra-Sauerstoff. Die Menge des von der Zelle in einer bestimmten Zeit aufgenommenen oder abgegebenen Sauerstoffs sei x_{O_2}, die Menge der von der Zelle gleichzeitig aufgenommenen oder abgegebenen Kohlensäure x_{CO_2}; Gasaufnahme werde negativ, Gasabgabe positiv gerechnet. Als Extra-Gas bezeichnen wir dann die algebraische Summe des Sauerstoff- und Kohlensäurewechsels, so daß

$$\text{Extra-Gas} = x_{O_2} + x_{CO_2}.$$

Im allgemeinen ist die Menge der abgegebenen Gase nahezu gleich der Menge der aufgenommenen Gase, die Ausscheidung an Extra-Gas also sehr klein. In dem Nitratgemisch ist ohne Bestrahlung, wie wir gesehen haben, die Kohlensäureabgabe größer als die Sauerstoffaufnahme, es wird Extra-Kohlensäure ausgeschieden; von einer bestimmten Intensität der Bestrahlung an ist die Sauerstoffabgabe größer als die Kohlensäureaufnahme, es wird Extra-Sauerstoff ausgeschieden.

b) Bestrahlen wir Algen unter Ausschluß von Kohlensäure, so wird gleichwohl, solange die Zelle lebt, Sauerstoff ausgeschieden, der aus Bestandteilen der Zelle — chemisch gebundener Kohlensäure oder anderen Stoffen — stammt. Die Geschwindigkeit dieser Sauerstoffproduktion ist in Lösungen von Chloriden, Sulfaten oder Phosphaten sehr klein, sie steigt auf den 15- bis 20fachen Wert, wenn wir die Algen in das Nitratgemisch bringen.

Die Ausscheidung von Extra-Sauerstoff in den Nitratgemischen wird verständlich auf Grund der Dunkelversuche; nehmen wir

Digitized by Google

an, daß bei Bestrahlung die Dunkelreaktion, in der die Salpetersäure reduziert wird, weitergeht, so muß hier das Extra-Gas in Form von Sauerstoff erscheinen, da Kohlensäure in einer bestrahlten Zelle nicht beständig ist. Als neue Tatsache jedoch kommt hinzu, daß Extra-Gas und Ammoniak bei Bestrahlung in sehr viel größeren Mengen auftreten als im Dunkeln.

Tabelle XII.

Lichtquelle 150 Kerzen in 4 ccm Entfernung.

Versuch		Extragas Milliontel Mole	Ammoniak Milliontel Mole	Mole Ammoniak auf 2 Mole Extragas
1 (Protokoll 30)	dunkel	7,2 (CO_2)	1,6	0,44
	hell	20,7 (O_2)	5,6	0,54
2 (Protokoll 31)	dunkel	5,9 (CO_2)	1,4	0,5
	hell	16,7 (O_2)	4,4	0,5
3 (Protokoll 32)	dunkel	5,9 (CO_2)	1,2	0,4
	hell	14,4 (O_2)	2,4	0,33
4 (Protokoll 33)	dunkel	1,4 (CO_2)		
	hell	12,2 (O_2)		

Versuch 1 bis 3 der Tabelle XII zeigen, in welchem Maß Extra-Gas- und Ammoniakausscheidung im allgemeinen durch Bestrahlung beschleunigt werden; es erscheint $2^1/_2$—3 mal soviel Extra-Sauerstoff, als Extra-Kohlensäure im Dunkeln, und gleichzeitig die 2—3fache Menge an Ammoniak.

Betrachten wir wiederum, wie im ersten Kapitel, als Maß des Gesamtstoffwechsels die Dunkelatmung in Knopscher Lösung und vergleichen die verschwindenden und entstehenden Gase nach Molen, so beträgt der bei Bestrahlung auftretende Extra-Sauerstoff rund 200% des Gesamtstoffwechsels. Diese tiefgreifende Veränderung der Lebenstätigkeit wird lange Zeit ertragen, ohne daß die Alge zugrunde geht.

Versuch 4 ist mit Zellen einer alten Kultur angestellt, in denen die Dunkelreduktion der Salpetersäure relativ langsam verläuft; hier steigt die Extra-Gasbildung bei Bestrahlung auf das 9fache.

c) Sind die Endprodukte der Nitratreduktion Sauerstoff und Ammoniak, so lautet die Gleichung der Reduktion

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2\,. \qquad (1)$$

Digitized by Google

Hiernach müßte mit 2 Molen Extra-Sauerstoff 1 Mol Ammoniak erscheinen, während (letzte Spalte der Tabelle XII) nur 0,3—0,5 Mole Ammoniak gefunden werden. Auch wenn man die Ausscheidung beider Stoffe 8 Stunden lang verfolgt, findet man keine Änderung zugunsten der Gleichung 1. Es besteht also, gegenüber dem Extra-Sauerstoff, ein „Ammoniakdefizit", zu dessen Erklärung nach anderen Reduktionsprodukten der Salpetersäure gesucht wurde.

Salpetrige Säure ließ sich mittels der empfindlichen Diazoreaktion nicht nachweisen, Stickoxydul war nach dem Verlauf der Gasanalysen (vgl. Kap. IV) auszuschließen. Auch Stickstoff, der nach Gleichung

$$2\,N_2O_5 = 2\,N_2 + 5\,O_2\,. \qquad (21)$$

entstehen könnte, bildet sich, wie eingehende Versuche zeigten, nicht; die Gasreste blieben während der Reduktion konstant (Protokoll 34).

Es scheint demnach, daß andere Reduktionsstufen der Salpetersäure neben Ammoniak nicht auftreten und daß das Ammoniakdefizit auf eine Stickstoffassimilation zurückzuführen ist. Die Reduktion nach Gleichung 1 wäre dann mit anderen Reduktionsvorgängen gekoppelt (Gleichung 14, Kap. IV), die neben der Nitratreduktion Quellen des Extra-Sauerstoffs sein könnten. Ebenso liegen die Verhältnisse anfänglich im Dunkeln; während jedoch hier die Assimilation allmählich gegen die Reduktion zurücktritt, wird bei Bestrahlung offenbar die Koppelung zwischen Assimilation und Reduktion nie gelöst.

X. Mechanismus der Lichtwirkung.

a) Folgt bei Bestrahlung auf die Dunkelreaktion

$$HNO_3 + H_2O + 2\,C = NH_3 + 2\,CO_2 + 162\,000\text{ cal.} \qquad (12)$$

die Reaktion

$$2\,CO_2 = 2\,C + 2\,O_2 - 230\,000\text{ cal.} \qquad (22)$$

so fällt die Kohlensäure, wie die Addition beider Gleichungen ergibt, aus der Bilanz heraus und wir erhalten für den Anfangs- und Endzustand

$$HNO_3 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2 - 68\,000\text{ cal.} \qquad (1)$$

Hierbei spielt die Kohlensäure als Zwischenkörper eine wichtige Rolle, indem durch ihre Vermittlung die zur Nitrat-

Digitized by Google

reduktion erforderlichen 68000 cal. Arbeit von der absorbierten Strahlung geleistet werden.

Diese Auffassung erklärt zunächst nur, daß bei Bestrahlung als Endprodukt der Reduktion statt Kohlensäure Sauerstoff erscheint, jedoch nicht, warum mehr Sauerstoff erscheint als Kohlensäure.

Die Frage, in welcher Weise Bestrahlung die Reduktion beschleunigt, konnte durch einen einfachen Versuch beantwortet werden. Bestrahlt man narkotisierte Zellen, in denen die Dunkelreduktion der Salpetersäure nur wenig, die Kohlensäureassimilation fast völlig gehemmt ist[1]), so steigt die Ausscheidung an Extra-Gas um einen ähnlichen Betrag, wie bei Bestrahlung normaler Zellen; das Extra-Gas in der Narkose ist jedoch kein Sauerstoff, sondern Kohlensäure (Tabelle XIII). Es geht daraus hervor, daß Bestrahlung den Vorgang nach Gleichung 12 beschleunigt, und daß zwei durchaus verschiedene Wirkungen der Bestrahlung zu unterscheiden sind, die Kohlensäureassimilation, in der die absorbierte Strahlung Arbeit leistet, und die Beschleunigung eines von selbst verlaufenden Vorgangs.

Tabelle XIII.

Nitratgemisch, 0,013% Phenylurethan.

Versuch		Extra-CO_2 ccm	$\frac{\text{Extra-}CO_2 \text{ hell}}{\text{Extra-}CO_2 \text{ dunkel}}$
1 (Protokoll 35 I)	dunkel	0,1	2,3
	hell*)	0,23	
2 (Protokoll 35 II)	dunkel	0,15	1,9
	hell*)	0,28	
3 (Protokoll 36)	dunkel	0,09	2,9
	hell*)	0,26	

*) 150 Kerzen in 4 cm Entfernung.

b) Liegt der Beschleunigung der Nitratreduktion und der Kohlensäureassimilation derselbe photochemische Primärvorgang zugrunde, so ist zu erwarten, daß wir ähnliche Wirkungen beobachten, wenn wir gleiche Mengen Strahlung absorbieren lassen. Zur Prüfung dieser Frage wurden die Geschwindigkeiten der

[1]) Vgl. Kapitel VII.

Digitized by Google

Nitratreduktion und der Kohlensäurereduktion bei verschiedenen Bestrahlungsintensitäten verglichen.

Nach früheren Versuchen wird die Wirkung der Bestrahlung auf die Kohlensäurereduktion für unser Versuchsobjekt bei einigen 100 Meterkerzen (Nitralampe) merklich und wächst bis zu Bestrahlungsintensitäten von einigen 10000 Meterkerzen [1]). In einem Gebiet gleicher Intensität beginnt und wächst die Wirkung auf die Nitratreduktion, wie Tabelle XIV zeigt.

Tabelle XIV.

Versuch	Intensität der Bestrahlung	Extragas	Extragas hell minus Extragas dunkel in ccm = Wirkung der Bestrahlung
1 (Protokoll 30)	dunkel	0,16	
	500 Meterkerzen	0,25	0,09
	über 20000 Meterkerzen	0,46	0,30
2 (Protokoll 31)	dunkel	0,13	
	500 Meterkerzen	0,22	0,09
	über 20000 Meterkerzen	0,37	0,24

c) Theorie. Wird die Geschwindigkeit der Nitratreduktion durch die Menge Salpetersäure bestimmt, die in einer gegebenen Zeit in die Zelle eindringt, so kann eine Beschleunigung nur eintreten, wenn sich der Aufnahmemechanismus ändert. In einer derartigen Änderung sehen wir zunächst den wahrscheinlichsten Grund für die beschleunigende Wirkung der Bestrahlung.

XI. Protokolle.

Versuchstemperatur-: 25 Grad.

„*G*": Gasanalytische Methode. x_{O_2} nach Gleichung 5, x_{CO_2} nach Gleichung 6 berechnet.

„*D*": Druckmethode. x_{O_2} nach Gleichung 7, x_{CO_2} nach Gleichung 11 berechnet. „Stickstoff" bei den Luftanalysen bedeutet den Gasrest der Luft, also Stickstoff + Edelgase.

Nr. 1. Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode.

Zellmaterial: In $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Für Gasanalyse die doppelte Zellkonzentration, wie für Druckmethode.

a) Gasanalyse. In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt, bei 25° mit Luft gesättigt. Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg.

$$v_P = 10\,; \quad v_G = 11{,}9\,; \quad K_{O_2} = 11{,}3\,; \quad K_{CO_2} = 18{,}5\,.$$

[1]) Diese Zeitschrift **100**, 256. 1919.

Digitized by Google

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Apparat 6,16 ccm. Gasvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 12,48 ccm. Eingesaugt: 6,32 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge: 12,28 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit: 11,16 ccm. $CO_2 = 0{,}20$ ccm $= 3{,}16\%$. $O_2 = 1{,}12$ ccm $= 17{,}7\%$. $N_2 = 79{,}1\%$.

$$x_{O_2} = -0{,}35 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = +0{,}56 \text{ ccm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = \mathbf{1{,}6}.$$

b) Druckmethode. Je 10 ccm Zellensuspension in die Gefäße I und II eingefüllt. In I 2 ccm KOH. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$; $v_M = 1{,}3$; $v_G = 20{,}7$. Konstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$; $v_M = 1{,}3$; $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6. 2. Gefäßkonstante 1,42.

Beobachtete Druckänderung in 60 Minuten in Glas I: -87 mm; Glas II: $+9$ mm.

$$x_{O_2} = -179 \text{ cmm}; \quad x_{CO_2} = +278 \text{ cmm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = \mathbf{1{,}56}.$$

c) aus a) und b), auf gleiche Zellmengen berechnet:

	Sauerstoffverbrauch	Kohlensäureproduktion	$\frac{CO_2}{O_2}$
Gasanalyse	0,35 ccm	0,56 ccm	1,6
Druckmethode	0,36 ccm	0,56 ccm	1,56

Nr. 2. Vergleich der gasanalytischen und der Druckmethode.

Zellmaterial: In $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan. Für Gasanalyse die doppelte Zellkonzentration, wie für Druckmethode.

a) Gasanalyse. In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt, bei 25° mit Luft gesättigt. Barometerstand bei Schluß der Hähne 757 mm Hg.

$$v_F = 10, \quad v_G = 10{,}7, \quad K_{O_2} = 10{,}12, \quad K_{CO_2} = 17{,}34.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Apparat: 7,12 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 13,13 ccm; eingesaugt: 6,01 ccm; nach Absorption durch Kalilauge: 12,96 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit: 11,92 ccm. $CO_2 = 0{,}17$ ccm $= 2{,}83\%$, $O_2 = 1{,}04$ ccm $= 17{,}3\%$. $N_2 = 79{,}9\%$.

$$x_{O_2} = -0{,}37 \text{ ccm}; \quad x_{CO_2} = +0{,}47 \text{ ccm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = \mathbf{1{,}27}.$$

b) Druckmethode. Je 10 ccm Zellsuspension in die Gefäße I und II eingefüllt. In den Einsatz von I 2 ccm Kalilauge. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$; $v_M = 1{,}1$; $v_G = 24{,}9$. Gefäßkonstante: 2,42.

Glas II: $v_F = 10$; $v_M = 1{,}2$; $v_G = 28{,}0$. 1. Gefäßkonstante: 3,5. 2. Gefäßkonstante: 1,28.

Digitized by Google

Druckänderung in Glas I nach 60 Minuten: −81 mm.
Druckänderung in Glas II nach 60 Minuten: 0 mm.

$$x_{O_2} = -196 \text{ cmm}; \quad x_{CO_2} = +251 \text{ cmm}; \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}28 .$$

aus a und b, auf gleiche Zellmengen berechnet:

	Sauerstoff-verbrauch	Kohlensäure-produktion	$\frac{CO_2}{O_2}$
Gasanalyse	0,37 ccm	0,47 ccm	1,27
Druckmethode	0,39 ccm	0,50 ccm	1,28

Nr. 3. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in $^n/_{10}$-$NaNO_3$ (*D*).

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in die Gefäße I und II eingefüllt, in den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit war eine $^1/_{10}$ normale Natriumnitratlösung. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$, Gefäßkonstante 2,42.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 28{,}0$, 1. Gefäßkonstante 3,5, 2. Gefäßkonstante 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60′: −43 mm. $x_{O_2} = -104$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60′: −8 mm. $x_{CO_2} = +105$ cmm.

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{105}{104} = 1 .$$

Nr. 4. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Schwefelsäure-Sulfatgemisch (*D*).

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in die Gefäße I und II eingefüllt, in den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit war eine $^n/_{10}$-Na_2SO_4, $^n/_{100}$-H_2SO_4-Lösung. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$, Gefäßkonstante 2,42.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 28{,}0$, 1. Gefäßkonstante 3,5, 2. Gefäßkonstante 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60′: −42 mm. $x_{O_2} = -102$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60′: −7 mm. $x_{CO_2} = +106$ cmm.

$$\text{Quotient } \frac{CO_2}{O_2} = \frac{106}{102} = 1 .$$

Nr. 5. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Kaliumphosphatlösung (*G*).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^m/_{10}$-KH_2PO_4-Lösung. Bei 25° Luft durchgeleitet bis zur Sättigung. Barometerstand bei Schluß der Hähne 750 mm Hg.

$$v_F = 10 , \quad v_G = 11{,}9 , \quad K_{O_2} = 11{,}3 , \quad K_{CO_2} = 18{,}5 .$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Digitized by Google

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 9,88 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 16,74 ccm. Eingesaugt 6,86 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 16,47 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 15,45 ccm. $CO_2 = 0{,}27$ ccm $= 3{,}94\%$. $O_2 = 1{,}02$ ccm $= 14{,}9\%$. $N_2 = 81{,}2\%$.

$$x_{O_2} = -0{,}65 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = +0{,}67 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}03.$$

Nr. 6. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Knopscher Lösung (*G*).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit Knopsche Lösung. Bei 25° Luft durchgeleitet bis zur Sättigung. Barometerstand bei Schluß der Hähne 750 mm Hg.

$$v_F = 10, \quad v_G = 11{,}9, \quad K_{O_2} = 11{,}3, \quad K_{CO_2} = 18{,}5.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,11 ccm. Eingesaugt 7,10 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 13,95 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit 12,71 ccm. $CO_2 = 0{,}16$ ccm $= 2{,}25\%$. $O_2 = 1{,}24$ ccm $= 17{,}5\%$. $N_2 = 80{,}3\%$.

$$x_{O_2} = -0{,}38 \text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = +0{,}38 \text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1.$$

Nr. 7. Sauerstoffverbrauch in Knopscher Lösung und in dem Nitratgemisch (*D*).

Je 10 ccm Zellsuspension wurden in Glas I und II eingefüllt, in die Einsätze beider Gläser 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit in Glas I war Knopsche Lösung, in Glas II $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 23{,}8$, Gefäßkonstante 2,23.
Glas II: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$, Gefäßkonstante 2,42.
Druckänderung in Glas I nach 60′: −65 mm. $x_{O_2} = -145$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60′: −82 mm. $x_{O_2} = -198$ cmm.

Resultat: In dem Nitratgemisch wird etwa **40% mehr Sauerstoff** verbraucht, als in der Knopschen Lösung.

Nr. 8. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (*G*).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Barometerstand bei Schluß der Hähne 754 mm Hg.

$$v_F = 10{,}0, \quad v_G = 9{,}7, \quad K_{O_2} = 9{,}2, \quad K_{CO_2} = 16{,}4.$$

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Digitized by Google

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Volumen der in den Analysenapparat eingesaugten Gasprobe 5,57 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 5,15 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit 4,48 ccm. $CO_2 = 0{,}42$ ccm $= 7{,}54\%$. $O_2 = 0{,}67$ ccm $= 12{,}03\%$. $N_2 = 80{,}4\%$.

$x_{O_2} = -0{,}8$ ccm, $x_{CO_2} = +1{,}16$ ccm, Extra-$CO_2 = 0{,}36$ ccm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}45$

Nr. 9. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (*G*).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Barometerstand bei Schluß der Hähne 751 mm Hg.

$v_P = 10{,}0$, $v_G = 9{,}7$, $K_{O_2} = 9{,}2$, $K_{CO_2} = 16{,}4$.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Volumen der in den Analysenapparat eingesaugten Gasprobe 7,07 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 6,67 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit 5,65 ccm. $CO_2 = 0{,}40$ ccm $= 5{,}66\%$. $O_2 = 1{,}02$ ccm $= 14{,}4\%$. $N_2 = 80{,}0\%$.

$x_{O_2} = -0{,}59$ ccm, $x_{CO_2} = +0{,}88$ ccm, Extra-$CO_2 = 0{,}29$ ccm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}5$.

Nr. 10. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (*G*).

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg.

$v_P = 10{,}0$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}1$, $K_{CO_2} = 17{,}3$.

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat: 6,97 ccm Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe: 13,38 ccm. Eingesaugt 6,41 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 13,20 ccm. Nach Absorption durch Hydrosulfit 12,07 ccm. $CO_2 = 0{,}18$ ccm $= 2{,}81\%$. $O_2 = 1{,}13$ ccm $= 17{,}6\%$. $N_2 = 79{,}6\%$.

$x_{O_2} = -0{,}34$ ccm, $x_{CO_2} = +0{,}47$ ccm, Extra-$CO_2 = 0{,}13$ ccm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}4$.

Nr. 11. Quotient $\frac{CO_2}{O_2}$ in Nitratgemisch (*D*).

Je 10 ccm Zellsuspension in die Gefäße I und II eingefüllt, in den Einsatz von Gefäß I 2 ccm Kalilauge. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Digitized by Google

Gefäß I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 24{,}5$. Gefäßkonstante 2,4.

Gefäß II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 25{,}8$. 1. Gefäßkonstante 3,24, 2. Gefäßkonstante 1,3

Druckänderung in Gefäß I nach 60′: −48 mm. $x_{O_2} = -115$ cmm.

Druckänderung in Gefäß II nach 60′: +10 mm. $x_{CO_2} = +182$ cmm.

Extra-CO_2 = 67 cmm, Quotient $\frac{CO_2}{O_2} = \frac{182}{115} = 1{,}6$.

Nr. 12. Extra-Kohlensäure und Ammoniak.

50 ccm Zellsuspension. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Davon je 10 ccm in Glas I und II für Gaswechselmessung nach Druckmethode, je 10 ccm in drei weitere Gläser für kolorimetrische Ammoniakbestimmung. Gasraum in beiden Fällen Luft. Die Druckänderungen in den Gläsern I und II wurden fortlaufend 4 Stunden lang beobachtet; zur Ammoniakbestimmung wurde nach einer, zwei und vier Stunden der Inhalt je eines Glases in ein Zentrifugierglas übergespült und im Zentrifugat der Ammoniakgehalt ermittelt.

a) Gaswechsel (*D*). In den Einsatz von Glas I 2 ccm Kalilauge.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$, Gefäßkonstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$, 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42

Tabelle XV.

Zeit	Druckänderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1. Stunde	−177	+45	−365	+635	1,7	270
2. Stunde	−142	+44	−293	+530	1,8	240
3. Stunde	−125	+26	−258	+434	1,7	180
4. Stunde	−117	+15	−241	+381	1,6	140

b) Ammoniak. Nach Folin in verdünnte Säure übergetrieben.

Nach 1 Stunde: Zentrifugat 10 ccm. Alles übergetrieben. Gehalt in Vorlage 0,5 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 1 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3.

Nach 2 Stunden: Zentrifugat auf 20 ccm. 10 ccm übergetrieben. Gehalt in Vorlage 1,0 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 2 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3. Gesamtproduktion an NH_3 also $4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 4 Stunden: Zentrifugat auf 40 ccm. 10 ccm übergetrieben. Gehalt in Vorlage 1,25 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 2{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3. Gesamtproduktion an NH_3 also $10 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a und b zusammengestellt. 10 ccm Zellsuspension scheiden aus:

Tabelle XVI.

Zeit	Extra-CO_2 cmm (0,760 mm)	NH_3 ccm $^n/_{1000}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1. Stunde	270	1	$12 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$	0,17
2. Stunde	240	3	$11 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-6}$	0,55
3. u. 4. Stde.	320	6	$14 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-6}$	0,86

Digitized by Google

Nr. 13. Extra-Kohlensäure und Ammoniak.

Gleichzeitige Bestimmung der Ausscheidung an beiden Stoffen in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Anordnung, wie in Protokoll 12 beschrieben.

a) Gaswechsel (*D*). 1,8 ccm Kalilauge in den Einsatz von Glas I.

Glas I: $v_F = 11{,}8$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}9$, Gefäßkonstante 2,07.

Glas II: $v_F = 10{,}0$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$, 1. Gefäßkonstante 2,6, 2. Gefäßkonstante 1,42

Tabelle XVII.

Zeit	Druckänderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1. Stunde	−113	+25	−233	+396	1,7	163
2. Stunde	−97	+25	−201	+350	1,7	149
3. Stunde	−86	+10	−178	+279	1,6	101

b) Ammoniak. Bestimmung direkt in den Zentrifugaten, die auf 20 ccm aufgefüllt wurden.

Nach 1 Stunde: 10 ccm = 0,3 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $1{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 2 Stunden: 5 ccm = 0,3 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 3 Stunden: 5 ccm = 0,6 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $4{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a und b zusammengestellt. 10 ccm Zellsuspension scheiden aus:

Tabelle XVIII.

Zeit	Extra-CO_2 cmm (0,760 mm)	NH_3 ccm $^n/_{1000}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1. Stunde	163	1,2	$7{,}2 \cdot 10^{-6}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	0,33
2. Stunde	149	1,2	$6{,}8 \cdot 10^{-6}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	0,35
3. Stunde	101	2,4	$4{,}5 \cdot 10^{-6}$	$2{,}4 \cdot 10^{-6}$	1,1

Nr. 14. Extra-Kohlensäure und Ammoniak.

Bestimmung der Ausscheidung an beiden Stoffen in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. Gaswechsel in 5 aufeinanderfolgenden Stunden, Ammoniakausscheidung in 3 aufeinanderfolgenden Stunden. Gasraum bei Beginn des Versuchs nicht Luft, sondern Sauerstoff (mit etwa 3% Stickstoff). Im übrigen Anordnung, wie in Protokoll 12 beschrieben.

a) Gaswechsel (*D*). 1,8 ccm Kalilauge in den Einsatz von Glas I.

Glas I: $v_F = 11{,}8$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}9$, Gefäßkonstante 2,07.

Glas II: $v_F = 10{,}0$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$, 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Digitized by Google

Tabelle XIX.

Zeit	Druckänderung mm beobachtet		Gaswechsel berechnet		$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 cmm
	Glas I	Glas II	cmm O_2	cmm CO_2		
1. Stunde	−122	+19	−253	+403	1,6	156
2. Stunde	−109	+17	−226	+365	1,6	139
3. Stunde	−97	+1	−201	+288	1,4	87
4. Stunde	−91	−8	−188	+246	1,3	58
5. Stunde	−73	−14	−151	+178	1,2	27

b) Ammoniak. Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten

Nach 1 Stunde: 10 ccm = 0,22 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}44 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $0{,}88 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 2 Stunden: 10 ccm = 0,55 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}1 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nach 3 Stunden: 10 ccm = 1,0 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $2{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a und b zusammengestellt. 10 cm Zellsuspension scheiden aus:

Tabelle XX.

Zeit	Extra-CO_2 cmm (0,760 mm)	NH_3 ccm $^n/_{1000}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
1. Stunde	156	0,9	$7 \cdot 10^{-6}$	$0{,}9 \cdot 10^{-6}$	0,26
2. Stunde	139	1,3	$6{,}3 \cdot 10^{-6}$	$1{,}3 \cdot 10^{-6}$	0,41
3. Stunde	87	1,8	$3{,}9 \cdot 10^{-6}$	$1{,}8 \cdot 10^{-6}$	0,92

Nr. 15. Entsteht bei der Reduktion der Salpetersäure freier Stickstoff?

In den Rezipienten 10 ccm Zellsuspension eingefüllt. Suspensionsflüssigkeit $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. 30 Minuten Sauerstoff durchgeleitet. Der Sauerstoff wurde elektrolytisch an einer Eisenelektrode entwickelt, zwischen Elektrolyseur und Rezipient war ein 30 cm langes, mit Kupferoxyd gefülltes glühendes Quarzrohr und eine in fließendem Wasser befindliche Kühlschlange geschaltet.

$$v_F = 10,\ v_G = 11{,}9,\ K_{CO_2} = 18{,}5$$

Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: Stickstoff im Analysenapparat 6,92 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 15,85 ccm. Eingesaugt 8,93 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge und Hydrosulfit 6,94 ccm. Gasrest in 6,92 ccm: 0,02 ccm.

Zusammensetzung der Gasmischung nach 120 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 6,99 ccm ; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,16 ccm; eingesaugt 6,17 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 12,47 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 7,01 ccm; Gasrest in 6,17 ccm:

Digitized by Google

0,02 ccm, d. h. **der Gasrest hat während des Versuchs nicht zugenommen.** $CO_2 = 0{,}69$ ccm $= 11{,}2\%$. Schätzung der Bildung an Extra-Kohlensäure: Nehmen wir an, der Gesamtdruck habe sich während des Versuchs nicht merklich geändert, so wird in Formel (3) $P' = P$ und $x_{CO_2} = 1{,}9$ ccm.

Im Mittel ist CO_2/O_2 in dem Nitratgemisch $= 1{,}5$ oder der dritte Teil der gebildeten Kohlensäure ist Extra-Kohlensäure, in unserem Fall 0,63 ccm.

Würde die Salpetersäure in den ersten Stunden vorwiegend nach der Gleichung

$$2\ N_2O_5 + 5\ C = 2\ N_2 + 5\ CO_2$$

reagieren, so müßten in unserem Fall $^2/_5 \cdot 0{,}63 = 0{,}25$ ccm Stickstoff ausgeschieden werden. Nach der Analyse ist die Stickstoffausscheidung jedenfalls kleiner als 0,01 ccm, ein Zerfall nach obiger Gleichung findet also in merklichem Betrage nicht statt.

Nr. 16. Das Verhältnis NH_3: Extra-CO_2 für N-reiche und N-arme Zellen.

Ungefähr gleiche Teile einer normalen, in Knopscher Lösung gezogenen Algenkultur durch mehrmaliges Waschen auf der Zentrifuge in eine **stickstoffhaltige** und eine **stickstofffreie** Lösung übergeführt. **Stickstoffhaltige Lösung:** Knop. **Stickstofffreie Lösung:** $^n/_{10}$-$NaHCO_3$. Beide Teile 16 Stunden bestrahlt unter Durchleitung von 4% CO_2-Luft. Dann zentrifugiert und, jede Kultur gesondert, in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 gebracht. Bestimmung des Gaswechsels und der NH_3-Ausscheidung in je 10 ccm. Gasraum Luft. Vergleichbar sind nicht die absoluten Werte, da die Vermehrung und somit die Zellenzahl ungleich war, sondern nur die Verhältniszahlen $CO_2 : O_2$ und NH_3 : Extra-CO_2.

a) Gaswechsel (*D*). Je 10 ccm Zellsuspension der normalen Kultur in die Gläser I und II, je 10 ccm der Bikarbonatkultur in die Gläser III und IV. In die Einsätze der Gläser I und III je 2 ccm Kalilauge.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$, Gefäßkonstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$, 1 Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Glas III: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$, Gefäßkonstante 2,06.

Glas IV: $v_F = 10$, $x_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$, 1 Gefäßkonstante 2 6 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 60′: -145 mm. $x_{O_2} = -299$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60′: $+23$ mm. $x_{CO_2} = +485$ cmm.
Druckänderung in Glas III nach 60′: -141 mm. $x_{O_2} = -291$ cmm.
Druckänderung in Glas IV nach 60′: $+16$ mm. $x_{CO_2} = +455$ cmm.

Normale Kultur: Extra-CO_2 186 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}6$.

Bikarbonatkultur: Extra-CO_2 164 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}56$.

b) Ammoniak. Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten.

Digitized by Google

Normalkultur: 10 ccm = 0,5 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 1 \cdot 10^{-6}$ Mole NH_3. Gesamt-$NH_3 = 2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Bikarbonatkultur: kein Ammoniak nachweisbar.

c) aus a und b zusammengestellt.

Tabelle XXI.

	$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra-CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
Normalkultur	1,6	$8{,}6 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$	0,47
Bikarbonatkultur . .	1,6	$7{,}2 \cdot 10^{-6}$	0	0

Nr. 17. Das Verhältnis NH_3 : Extra-CO_2 für N-reiche und N-arme Zellen.

Ungefähr gleiche Teile einer normalen, in Knopscher Lösung gezogenen Algenkultur durch mehrmaliges Waschen auf der Zentrifuge in eine stickstoffreiche und eine stickstofffreie Lösung übergeführt. Stickstoffreiche Lösung: Knop, mit Kaliumnitratzusatz bis zu 1%. Stickstofffreie Lösung: Knop, worin die Nitrate durch Chloride ersetzt waren. Beide Teile 24 Stunden bestrahlt unter Durchleitung von 4% CO_2-Luft. Dann zentrifugiert und, jede Kultur gesondert, in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3 gebracht. Bestimmung des Gaswechsels und der NH_3-Ausscheidung in je 10 ccm. Gasraum Luft. Vergleichbar sind nicht die absoluten Werte, da die Vermehrung und somit die Zellenzahl ungleich war, sondern nur die Verhältniszahlen $CO_2 : O_2$ und NH_3 : Extra-CO_2.

a) Gaswechsel (*D*). Je 10 ccm Suspension N-reicher Zellen in die Gläser I und II, je 10 ccm Suspension N-armer Zellen in die Gläser III und IV. In die Einsätze der Gläser I und III je 2 ccm Kalilauge.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Glas III: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$. Gefäßkonstante 2,06.

Glas IV: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$. 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 120′: -193 mm. $x_{O_2} = -398$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 120′: $+64$ mm. $x_{CO_2} = +731$ cmm.
Druckänderung in Glas III nach 120′: -126 mm. $x_{O_2} = -260$ cmm.
Druckänderung in Glas IV nach 120′: $+24$ mm. $x_{CO_2} = +432$ cmm.

Für N-reiche Zellen: Extra-CO_2 333 cmm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}8$.

Für N-arme Zellen: Extra-CO_2 172 cmm; $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}7$.

b) Ammoniak. Bestimmung direkt in den auf 20 ccm aufgefüllten Zentrifugaten.

Digitized by Google

N-reiche Zellen: 10 ccm = 0,9 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $3{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole.

N-arme Zellen: kein NH_3 nachweisbar.

c) aus a und b zusammengestellt.

Tabelle XXII.

	$\frac{CO_2}{O_2}$	Extra—CO_2 Mole	NH_3 Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extra-CO_2
N-reiche Zellen . .	1,8	$15 \cdot 10^{-6}$	$3{,}6 \cdot 10^{-6}$	0,48
N-arme Zellen . . .	1,7	$7{,}7 \cdot 10^{-6}$	0	0

Nr. 18. Wirkung der Blausäure auf die Atmung in den Nitratgemischen.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure. Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen: 10 ccm.

Je 10 ccm Zellsuspension in 4 Gefäße der Form Fig. 1, deren Einsatz mit 2 ccm Kalilauge gefüllt war

Tabelle XXIII.

HCN Mole pro Liter	0	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Im Einsatz KOH . ccm	2	2	2	2
v_r . . . . . ccm	12	12	12	12
v_M . . . . . ccm	1,1	1,2	0,9	1,1
v_G . . . . . ccm	23,8	24,5	23,5	24,9
Gefäßkonstanten	2,3	2,4	2,3	2,4
Druckänderungen nach 60′ . . . . . mm	−84	−79	−75	−60
x_{O_2}	−193	−190	−171	−145
Hemmung d. Atmung %		1,5	13	26

Nr. 19. Wirkung der Blausäure auf die Kohlensäureassimilation in Nitratgemischen.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure. Suspensionsdichte: 0,02 ccm Zellen: 10 ccm.

Je 8,5 ccm Zellsuspension in 3 Gefäße gleichen Rauminhalts eingefüllt (Form vgl. diese Zeitschr. **100**, 246, Fig. 3). Gasraum 4% CO_2 in Luft. Für alle 3 Gefäße: $v_F = 8{,}5$, $v_G = 10$. Gefäßkonstante 2,4, berechnet nach dieser Zeitschr. **100**, 237, Gleichung 2

Lichtquelle: Metallfadenlampe von 40 Kerzen, in 4 ccm Entfernung von den Gefäßen. Meßmethode: Anordnung I, diese Zeitschr. **100**, 245.

Tabelle XXIV.

HCN Mole pro Liter	0	10^{-6}	10^{-5}
Druckänderung nach 45′ . mm	+92	+94	+75
Zersetzte CO_2-Mengen . . ccm	221	226	180
Hemmung der Assimilation %		—	19

Digitized by Google

Nr. 20. Wirkung der Blausäure auf die Ausscheidung von Extra-CO_2 und Ammoniak.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, ohne und mit Blausäure. Von 6 Glasgefäßen wurde je ein Paar mit je 10 ccm Zellsuspension gefüllt, ein Einsatz jedes Paares außerdem mit 1 ccm Kalilauge. Nach Einhängen in den Thermostaten wurden die in 60 Minuten auftretenden Druckänderungen abgelesen. Dann wurde der Inhalt je eines Glases gesondert zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit auf 20 ccm aufgefüllt und das Ammoniak bestimmt. Die colorimetrische Bestimmung des Ammoniaks wird durch HCN-Konzentrationen bis zu 10^{-5} Molen pro Liter nicht beeinträchtigt, so daß es nicht nötig war, das Ammoniak nach Folin überzutreiben.

a) Gaswechsel.

Tabelle XXV.

HCN Mole pro Liter	0		10^{-6}		10^{-5}	
Im Einsatz KOH . . . ccm	—	1	—	1	—	1
v_F . . . . . ccm	10	11	10	11	10	11
v_M . . . . . ccm	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
v_G . . . . . ccm	18,3	21,7	18,3	21,7	18,3	21,7
Gefäßkonstanten	2,6 1,42	2,15	2,6 1,42	2,15	2.6 1,42	2,15
Druckänderungen nach 30′ mm	+28	−106	−11	−116	−30	−100
x_{O_2} und x_{CO_2} . . . . . cmm	+387	−228	+314	−249	+227	−215
Extra—CO_2 . . . . . cmm	159		65		12	
Extra—CO_2 10^{-6} Mole . . .	7,2		2,9		0,5	

b) NH_3 in den auf 20 ccm verdünnten Zentrifugaten. Ohne HCN: 10 ccm = 0,45 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}9 \cdot 10^{-6}$ Mole. Sa. $1{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole.

10^{-6} n · HCN: 10 ccm = 0,07 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}14 \cdot 10^{-6}$ Mole. Sa. $0{,}28 \cdot 10^{-6}$ Mole.

10^{-5} n · HCN: kein Ammoniak nachweisbar.

Nr. 21. Wirkung der Blausäure auf die Ausscheidung von Extra-CO_2 und Ammoniak.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, mit und ohne Blausäure.

Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen: 10 ccm

Gaswechsel nach der Druckmethode, wie in vorhergehendem Protokoll, Ammoniakbestimmung in den unverdünnten, durch Zentrifugieren von den Zellen abgetrennten Flüssigkeiten.

a) Gaswechsel. Tabelle XXVI.

b) NH_3.

Ohne HCN: 10 ccm = 1,3 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 2{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole.

10^{-5} HCN: 10 ccm = 0,05 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}1 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Digitized by Google

Tabelle XXVI.

HCN Mole pro Liter	0		10^{-5}	
Im Einsatz KOH . . . . ccm	—	2	—	2
v_F . . . . . ccm	10	12	10	12
v_M . . . . . ccm	1,1	1,2	0,9	1,1
v_G . . . . . ccm	25,8	24,5	25,5	24,9
Gefäßkonstanten	3,24 1,3	2,4	3,22 1,3	2,42
Druckänderungen nach 120′ mm	+52	−150	−30	−146
x_{O_2} und x_{CO_2} . . . . . cmm	+637	−360	+363	−353
Extra—CO_2 . . . . . cmm	277		10	
Extra—CO_2 Millionstel Mole	12,6		0,45	

Nr. 22. Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (*D*)

Zellsuspension in $^n/_{10}$-$NaNO_3$ vermischt mit gleichem Volumen a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3, b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3, 0,026 % Phenylurethan. Es entstand hierbei im Fall a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, im Fall b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan. Je 10 ccm von a) wurden in die Gläser I und II, je 10 ccm von b) in die Gläser III und IV eingefüllt, in die Einsätze von I und III je 2 ccm Kalilauge. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 24{,}5$; Gefäßsubstante 2,4.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 25{,}8$; 1. Gefäßkonstante 3,24; 2. Gefäßkonstante 1,3.

Glas III: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}1$, $v_G = 24{,}9$; Gefäßkonstante 2,42.

Glas IV: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}2$, $v_G = 28{,}0$; 1 Gefäßkonstante 3,5; 2. Gefäßkonstante 1,28.

Druckänderung in Glas I nach 60′:
−69 mm. $x_{O_2} = -166$ cmm
Druckänderung in Glas II nach 60′:
+10 mm. $x_{CO_2} = +248$ cmm
} ohne Phenylurethan

Druckänderung in Glas III nach 60′:
−81 mm. $x_{O_2} = -196$ cmm
Druckänderung in Glas IV nach 60′:
0 mm. $x_{CO_2} = +251$ cmm
} mit Phenylurethan

Ohne Phenylurethan: $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}5$, Extra-$CO_2 = 82$ cmm.

Mit Phenylurethan $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}3$, Extra-$CO_2 = 55$ cmm. Hemmung der Extra-CO_2 Bildung $\frac{82 - 55}{82} \cdot 100 = 33\%$.

Digitized by Google

Nr. 23. Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (*D*).

Suspensionsflüssigkeit a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan. Hersteliung, wie in dem vorhergehenden Protokoll beschrieben. Je 10 ccm von a) wurden in die Gläser I und II, je 10 ccm von b) in die Gläser III und IV eingefüllt, in die Einsätze von I und III je 2 ccm Kalilauge. Gasraum Luft.

Glas I: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$; Gefäßkonstante 2,06.

Glas II: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$; 1. Gefäßkonstante 2,6; 2. Gefäßkonstante 1,42.

Glas III: $v_F = 12$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 20{,}7$; Gefäßkonstante 2,06.

Glas IV: $v_F = 10$, $v_M = 1{,}3$, $v_G = 18{,}3$; 1. Gefäßkonstante 2,6. 2. Gefäßkonstante 1,42.

Druckänderung in Glas I nach 60′: -103 mm $x_{O_2} = -212$ cmm.
Druckänderung in Glas II nach 60′: $+4$ mm $x_{CO_2} = +311$ cmm.
Druckänderung in Glas III nach 60′: -122 mm $x_{O_2} = -251$ cmm.
Druckänderung in Glas IV nach 60′: -13 mm $x_{CO_2} = +323$ cmm.

Ohne Phenylurethan: $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}5$, **Extra-CO_2 = 99 cmm.**

Mit Phenylurethan: $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}3$, **Extra-CO_2 = 72 cmm.** Hemmung der Extra-CO_2-Bildung $\frac{99 - 72}{99} \cdot 100 = 27\%$.

Nr. 24. Wirkung von Phenylurethan auf die Ausscheidung der Extra-CO_2 (*G*).

Suspensionsflüssigkeit a) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3. b) $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan. Herstellung, wie in Protokoll 22 beschrieben. Je 10 ccm in den Rezipienten eingefüllt, für den

$$v_F = 10,\ v_G = 11{,}9,\ K_{O_2} = 11{,}3,\ K_{CO_2} = 18{,}5.$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% CO_2, 20,9% O_2, 79,1% N_2.

a) ohne Phenylurethan. Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 6,16 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 12,48 ccm, eingesaugt 6,32 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,28 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,16 ccm. CO_2 = 0,20 ccm = 3,16 %. O_2 = 1,12 ccm = 17,7% N_2 = 79,1%.

$x_{O_2} = -0{,}35$ ccm, $x_{CO_2} = +0{,}56$ ccm, $\frac{CO_2}{O_2} = 1{,}6$, **Extra-CO_2 = 0,21 ccm.**

b) mit Phenylurethan. Barometerstand bei Schluß der Hähne 753 mm Hg.

Digitized by Google

Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 Minuten: Stickstoff im Analysenapparat 6,38 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,10 ccm, eingesaugt 6,72 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 12,88 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,73 ccm $CO_2 = 0{,}22$ ccm $= 3{,}27\%$ · $O_2 = 1{,}15$ ccm $= 17{,}1\%$. $N_2 = 79{,}6\%$.

$$x_{O_2} = -0{,}43\text{ ccm}, \quad x_{CO_2} = +0{,}58\text{ ccm}, \quad \frac{CO_2}{O_2} = 1{,}35, \quad \text{Extra-}CO_2 = 0{,}15\text{ ccm}.$$

c) aus a) und b): Phenylurethan hemmt die Extra-CO_2-Bildung um $\frac{0{,}21 - 0{,}15}{0{,}21} \cdot 100 = 30\%$

Nr. 25. Schädigung durch Sauerstoffmangel.

Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen (= 20 mg. Trockensubstanz) auf 10 ccm. Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Je 10 ccm unter Luftabschluß bei 25°, vor Licht geschützt. Nach 0′, 30′, 60′ und 90′ der Inhalt je eines Zylinders zentrifugiert, das Sediment mit einer Mischung von 85 Teilen $^n/_{10}$-$NaHCO_3$ und 15 Teilen $^n/_{10}$-Na_2CO_3 gewaschen und schließlich so verdünnt, daß auf 8 ccm 0,02 ccm Zellen kamen. Diese in Assimilationsgefäße eingefüllt, für die

$$v_F = 8, \quad v_G = 10{,}5, \quad K = 1$$

und 15 Minuten mit etwa 10 000 Lux bestrahlt. Druckänderungen nach 15 Minuten Bestrahlung: +60 (Exposition 0′); +46 (Exposition 30′); +18 (Exposition 60′); +5 (Exposition 90′). Da $K = 1$, so sind die gleichen Mengen CO_2 (cmm, 0°, 760 mm) zersetzt.

Nr. 26. Bildung von salpetriger Säure bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen auf 10 ccm.

Vier Glaszylinder von 10 ccm Inhalt wurden mit Zellsuspension gefüllt, durch eingeschliffene Stöpsel unter Vermeidung von Luftblasen verschlossen und in ein vor Licht geschütztes Wasserbad von 25° eingestellt. Nach verschiedenen Zeiten wurde der Inhalt je eines Zylinders zentrifugiert und in je 0,5 ccm der auf das doppelte verdünnten überstehenden Flüssigkeit die salpetrige Säure nach Ilosvay bestimmt. Hierzu wurde mit Wasser auf 10 ccm aufgefüllt, 1 ccm Diazoreagenz zugesetzt und einige Zeit auf 80° erwärmt. Zum Vergleich dienten Verdünnungen einer 10^{-5} normalen Kaliumnitritlösung.

Nach 60 Minuten Sauerstoffmangel: 0,5 ccm = 1,5 ccm 10^{-5} normal KNO_2. Die auf das doppelte verdünnte überstehende Flüssigkeit war also in bezug auf $HNO_2 = 3 \cdot 10^{-5}$ normal oder die unverdünnte überstehende Flüssigkeit $6 \cdot 10^{-5}$ normal. Da 1 ccm 10^{-5} normale HNO_2-Lösung 10^{-8} Mole HNO_2 enthält, so waren auf 10 ccm, das heißt von 0,1 ccm Zellen, $6 \cdot 10^{-7}$ Mole HNO_2 abgeschieden.

Nach 90, 120 und 150 Minuten Sauerstoffmangel wurde der gleiche Gehalt an HNO_2 gefunden, HNO_2 wird also nur in der ersten Zeit nach Abschluß des Sauerstoffs ausgeschieden.

Digitized by Google

Die überstehenden Flüssigkeiten färben eine stärkehaltige Jodkaliumlösung blau; die Intensität dieser Reaktion wird im Laufe von Stunden intensiver. Bekanntlich ist die Diazoreaktion, nicht aber die Jodstärkereaktion, eine eindeutige Reaktion auf salpetrige Säure.

Nr. 27. Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.
Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.
Je 10 ccm a) 4 Stunden mit Luft geschüttelt,
b) 4 Stunden mit 1% Sauerstoff in Stickstoff geschüttelt.
Nach dieser Zeit war a) unverändert grün, b) braun. Zur Ammoniakbestimmung wurde zentrifugiert und das Ammoniak aus den passend verdünnten überstehenden Flüssigkeiten nach Folin übergetrieben.

a) überstehende Flüssigkeit auf 40 ccm. 10 ccm = 0,4 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamtammoniak $3{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

b) überstehende Flüssigkeit insgesamt = 0,04 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}08 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamtammoniak $0{,}08 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nr. 28. Ammoniakausscheidung bei Sauerstoffmangel.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.
Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.
Je 20 ccm a) mit Luft, b) mit 1% Sauerstoff in Stickstoff geschüttelt. Nach einer und zwei Stunden je 10 ccm von a) und b) zentrifugiert und das Ammoniak nach Folin bestimmt.

Gasraum Luft, nach einer Stunde: Gesamtmenge der überstehenden Flüssigkeit übergetrieben. In der Vorlage gefunden 0,5 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Gasraum Luft, nach 2 Stunden: die Hälfte der überstehenden Flüssigkeit übergetrieben. In der Vorlage gefunden 1,0 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $2 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamtammoniak $4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Gasraum 1% Sauerstoff, nach einer Stunde: Gesamtmenge der überstehenden Flüssigkeit übergetrieben. In der Vorlage gefunden 0,1 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Gasraum 1% Sauerstoff, nach 2 Stunden: Gesamtmenge der überstehenden Flüssigkeit übergetrieben. In der Vorlage gefunden 0,1 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Nr. 29. Einfluß des Sauerstoffdrucks auf Sauerstoffverbrauch, Ammoniak- und Nitritausscheidung.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.
Suspensionsdichte: 0,1 ccm Zellen: 10 ccm

Je 10 ccm Zellsuspension wurde in 8 Gefäße der Form Fig. 1 eingefüllt, in die Einsätze von 4 Gefäßen je 2 ccm Kalilauge. Die Gefäße wurden zu 4 Paaren so zusammengestellt, daß sich in jedem Paar ein kalilaugefreier und ein kalilaugehaltiger Einsatz befand. Je ein Paar wurde mit derselben Gasmischung, Sauerstoff in Stickstoff, gefüllt. Nach 30 Minuten langem Schütteln im Thermostaten wurden die Druckänderungen abgelesen,

Digitized by Google

dann der Inhalt jedes Gefäßpaares gesondert zentrifugiert und in den überstehenden Flüssigkeiten Ammoniak und salpetrige Säure bestimmt.

Gasräume und Zellmengen waren so gewählt, daß sich der Sauerstoffgehalt der Gasmischungen im Lauf des Versuchs nur unwesentlich änderte.

a) Gaswechsel.

Tabelle XXVII.

O_2-Druck Atmosphären	0,01		0,017		0,055		0,21	
Im Einsatz KOH . . ccm	—	2	—	2	—	2	—	2
v_T . . . . . ccm	10	12	10	12	10	12	10	12
v_M . . . . . ccm	0,9	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	0,9	1,2
v_G . . . . . ccm	25,5	24,9	25,8	24,5	25,8	24,5	25,5	24,9
Gefäßkonstanten	3,22 1,3	2,42	3,24 1,3	2,4	3,24 1,3	2,4	3,22 1,3	2,42
Druckänderung n. 30′ mm	+12	−16	+11	−22	+18	−42	+24	−45
x_{O_2} und x_{CO_2} . . . cmm	+89	−39	+105	−53	+190	−101	+219	−109
Extra—CO_2 . . . cmm	50		52		89		110	
Sauerstoffverbr. 10^{-6} Mole		1,8		2,4		4,5		4,9

b) NH_3 in 10 ccm der Zentrifugate

Mit O_2 von 0,01 Atm. geschüttelt: 0,17 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,34 · 10^{-6} Mole.

Mit O_2 von 0,017 Atm. geschüttelt: 0,23 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,46 · 10^{-6} Mole.

Mit O_2 von 0,055 Atm. geschüttelt: 0,45 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 0,9 · 10^{-6} Mole.

Mit O_2 von 0,21 Atm. geschüttelt: 0,5 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = 1,0 · 10^{-6} Mole.

c) HNO_2 in der Suspensionsflüssigkeit.

Mit O_2 von 0,01 Atm. geschüttelt: 0,5 ccm = 1,3 ccm 10^{-5} n-HNO_2. Sa. 26 ccm 10^{-5} n-HNO_2 = 26 · 10^{-8} Mole.

Mit O_2 von 0,017 Atm. geschüttelt: 0,5 ccm = 1,0 ccm 10^{-5} n-HNO_2 Sa. 20 ccm 10^{-5} n-HNO = 20 · 10^{-8} Mole.

Mit O_2 von 0,055 Atm. geschüttelt: 5 ccm = 0,2 ccm 10^{-5} n-HNO_2. Sa. 0,4 ccm 10^{-5} n-HNO_2 = 0,4 · 10^{-8} Mole.

Mit O_2 von 0,21 Atm. geschüttelt: keine HNO_2 nachweisbar.

Zusammenstellung der Resultate im Text, Tabelle XI.

Nr. 30. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_2.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Lichtquellen: Metallfadenlampen von 150 Kerzen und von 25 Kerzen.

Bestrahlung: nach Anordnung IV, Fig. 8, diese Zeitschr. **100**, 250.

Versuchsanordnung: Für je 10 ccm Zellsuspension wurde der Sauerstoff- und Kohlensäurewechsel, ohne Bestrahlung und bei verschiedenen Intensitäten der Bestrahlung, gasanalytisch bestimmt. Nach Entnahme der Gasprobe wurde der Inhalt des Rezipienten sofort zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit auf 20 ccm verdünnt und der Ammoniakgehalt colorimetrisch festgestellt. Für jede Messung wurde die Nitragemisch-Suspension frisch bereitet; als Stammsuspension diente eine bei Zimmertemperatur aufbewahrte Suspension in $^n/_{10}$-$NaNO_3$, die direkt vor Be-

Digitized by Google

ginn des Versuchs mit dem gleichen Volumen einer $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3-Lösung gemischt wurde.

a) Gasanalyse.

Rezipient: $v_F = 10$, $v_0 = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Dunkel: Barometerstand bei Schluß der Hähne 763 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60 : Stickstoff im Analysenapparat 6,94 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,46 ccm, eingesaugt 6,52 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 13,25 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 12,13 ccm. $CO_2 = 0{,}21$ ccm = 3,2%. $O_2 = 1{,}12$ ccm = 17,2%. $N_2 = 79{,}6\%$.

$x_{O_2} = -0{,}38$ ccm; $x_{CO_2} = +0{,}54$ ccm. Extra-CO_2: **0,16** ccm.

Niedrige Lichtstärke (25 Kerzen, 19 cm vom Rezipienten): Barometerstand bei Schluß der Hähne 763 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 6,85 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,31 ccm, eingesaugt 6,46 ccm, nach Absorption durch Kalilauge 13,17 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 11,91 ccm. $CO_2 = 0{,}14$ ccm = 2,17%. $O_2 = 1{,}26$ ccm = 19,5%. $N_2 = 78{,}3\%$.

$x_{O_2} = -0{,}12$ ccm. $x_{CO_2} = +0{,}37$ ccm. Extra-CO_2: **0,25** ccm.

Hohe Lichtstärke (150 Kerzen, 4 cm vom Rezipienten): Barometerstand bei Schluß der Hähne 762 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 7,05 ccm, Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,26 ccm, eingesaugt 7,21 ccm. Nach Absorption durch Kalilauge 14,26 ccm, nach Absorption durch Hydrosulfit 12,5 ccm. CO_2: —. O_2: 1,76 ccm = 24,4%.

x_{O_2}: + 0,46 ccm. x_{CO_2}: — Extra-Sauerstoff: **0,46** ccm.

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdünnen der überstehenden Flüssigkeit auf 20 ccm:

Dunkel: 10 ccm = 0,4 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-$NH_3 = 1{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Niedrige Lichtstärke: 10 ccm = 0,3 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-$NH_3 = 1{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Hohe Lichtstärke: 5 ccm = 0,7 ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 1{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-$NH_3 = 5{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a) und b) zusammengestellt:

Tabelle XXVIII.

10 ccm Zellsuspension scheiden in 60′ aus.

	Extragas ccm	Extragas Millionstel Mole	NH_3 Millionstel Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extragas
Dunkel	0,16 (CO_2)	7,2	1,6	0,44
Niedr. Lichtstärke	0,25 (CO_2)	11,3	1,2	0,2
Hohe Lichtstärke	0,46 (O_2)	20,7	5,6	0,54

Digitized by Google

Nr. 31. **Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.**

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Anordnung wie in Protokoll 30.

a) Gasanalyse. Rezipient: $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$; $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Dunkel: Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 6,97 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,38 ccm; eingesaugt 6,41 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,20 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,07 ccm. $CO_2 = 0{,}18$ ccm $= 2{,}81\%$; $O_2 = 1{,}13$ ccm $= 17{,}6\%$; $N_2 = 79{,}6\%$.

$x_{O_2} = -0{,}34$ ccm; $x_{CO_2} = +0{,}47$ ccm. Extra-$CO_2 = 0{,}13$ ccm.

Niedrige Lichtstärke (25 Kerzen, 19 cm). Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 6,93 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,44 ccm; eingesaugt 6,51 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,33 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,03 ccm. $CO_2 = 0{,}11$ ccm $= 1{,}7\%$, $O_2 = 1{,}3$ ccm $= 20\%$. $N_2 = 78{,}3\%$.

$x_{O_2} = -0{,}07$ ccm; $x_{CO_2} = +0{,}29$ ccm. Extra-$CO_2 = 0{,}22$ ccm.

Hohe Lichtstärke (150 Kerzen, 4 cm). Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 6,93 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,61 ccm; eingesaugt 6,68 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,61 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,03 ccm. CO_2 —. $O_2 = 1{,}58$ ccm $= 23{,}7\%$. $N_2 = 76{,}3\%$.

$x_{O_2} = +0{,}37$ ccm. $x_{CO_2} = 0$. Extra-Sauerstoff $= 0{,}37$ ccm.

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdünnen der überstehenden Flüssigkeit 20 ccm:

Dunkel: 10 ccm $= 0{,}35$ ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}7 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-$NH_3 = 1{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Niedrige Lichtstärke: 10 ccm $= 0{,}33$ ccm $^n/_{500}$-$NH_3 = 0{,}66 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-$NH_3 = 1{,}3 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Tabelle XXIX.

10 ccm Zellsuspension scheiden in 60′ aus

	Extragas ccm	Extragas Milliontel Mole	Ammoniak Milliontel Mole	Mole NH_3 auf 2 Mole Extragas
Dunkel	0,13 (CO_2)	5,9	1,4	0,5
Niedr. Lichtstärke	0,22 (CO_2)	9,9	1,3	0,26
Hohe Lichtstärke	0,37 (O_2)	16,7	4,4	0,5

Digitized by Google

Hohe Lichtstärke: 5 ccm = 0,55 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}1 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $4{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a und b zusammengestellt:

Nr. 32. Extra-Sauerstoff und Ammoniak bei Bestrahlung.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_2$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Zur Bestimmung 8 ccm Zellsuspension, im übrigen Anordnung wie in Protokoll 30.

a) Gasanalyse. Rezipient: v_P=8, v_G=6,9, K_{O_2}=6.57, K_{CO_2}=12,35

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Dunkel. Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm. Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 11,93 ccm; eingesaugt 4,92 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 11,75 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 10,95 ccm. CO_2 = 0,18 ccm = 3,66%, O_2 = 0,8 ccm = 16,3%. N_2 = 80,1%

$x_{O_2} = -0{,}31$ ccm; $x_{CO_2} = +0{,}44$ ccm. Extra-CO_2 = **0,13** ccm.

Hohe Lichtstärke: Barometerstand bei Schluß der Hähne 761 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′: Stickstoff im Analysenapparat 7,01 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 12,23 ccm; eingesaugt 5,22 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 12,23 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 10,94 ccm. CO_2: —. O_2 = 1,29 ccm = 24,7%. N_2 = 75,3%

$x_{O_2} = +0{,}32$ ccm. $x_{CO_2} = -$. Extra-Sauerstoff = **0,32** ccm.

b) NH_3 nach Zentrifugieren und Verdünnen der überstehenden Flüssigkeit auf 20 ccm.

Dunkel: 10 ccm = 0,3 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $0{,}6 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $1{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole.

Hell: 10 ccm = 0,6 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}2 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole.

c) aus a und b zusammengestellt.

Tabelle XXX.

8 ccm Zellsuspension scheiden in 60′ aus

	Extragas ccm	Extragas Milliontel Mole	Ammoniak Milliontel Mole	Mole Ammon. a. 2 Mole Extragas
Dunkel	0,13 (CO_2)	5,9	1,2	0,4
Hohe Lichtstärke	0,32 (O_2)	14,4	2,4	0,33

Nr 33. Extragas bei Bestrahlung alter Zellen

Zellmaterial: aus alter Kultur, in der die Zellen sedimentiert waren.

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Digitized by Google

Zur Bestimmung 10 ccm Zellsuspension, Anordnung wie in Protokoll 30. Gasanalyse: Rezipient: $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$. Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Dunkel: Barometerstand bei Schluß der Hähne 766 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 90′: Stickstoff im Analysenapparat 6,72 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,05 ccm; eingesaugt 6,33 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 12,92 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 11,78 ccm. $CO_2 = 0{,}13$ ccm $= 2{,}05\%$, $O_2 = 1{,}14$ ccm $= 18{,}01\%$. $N_2 = 79{,}9\%$.

$x_{O_2} = -0{,}31$ ccm. $x_{CO_2} = +0{,}34$ ccm. Extra-$CO_2 = 0{,}03$ ccm.

Hell (150 Kerzen, 4 cm). Barometerstand bei Schluß der Hähne 766 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 90 : Stickstoff im Analysenapparat 7,00 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,55 ccm; eingesaugt 6,55 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,55 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,05 ccm. CO_2 : — $O_2 = 1{,}5$ ccm $= 22{,}9\%$.

$x_{O_2} = +0{,}27$ ccm x_{CO_2}: —. Extra-Sauerstoff = 0,27 ccm.

Nr. 34. Bildet sich bei Bestrahlung in dem Nitratgemisch freier Stickstoff?

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Zunächst wurde für 10 ccm Zellsuspension Gaswechsel und Ammoniakausscheidung bei Bestrahlung bestimmt, indem der Gasraum Luft war. Dieser Versuch ergab das Ammoniakdefizit oder die zu erwartende Menge an freiem Stickstoff. Dann wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt mit dem Unterschied, daß mit elektrolytisch gewonnenem Sauerstoff gesättigt wurde. (Darstellung des Sauerstoffs vgl. Protokoll 15.) Durch den zweiten Versuch wurde festgestellt, ob eine Vermehrung des Gasrestes von der Größenordnung des Ammoniakdefizits auftrat.

a) Gasanalyse in Luft. Rezipient $v_F = 10$, $v_G = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Barometerstand bei Schluß der Hähne 762 mm Hg. Prozentische Zusammensetzung der Gasmischung nach 60′ Bestrahlung (150 Kerzen, 4 cm): Stickstoff im Analysenapparat 7,08 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 13,88 ccm; Eingesaugt 6,80 ccm; nach Absorption durch Kalilauge 13,88 ccm; nach Absorption durch Hydrosulfit 12,25 ccm. CO_2 : —. $O_2 = 1{,}63 = 24{,}0\%$. $N_2 = 76\%$.

$x_{O_2} = +0{,}40$ ccm. x_{CO_2} : —. Extra-Sauerstoff = 0,40 ccm.

Digitized by Google

b) Ammoniak nach Zentrifugieren in der überstehenden auf 20 ccm verdünnten Flüssigkeit.

10 ccm = 0,7 ccm $^n/_{500}$-NH_3 = $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ Mole. Gesamt-NH_3 = $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole.

a') Gasanalyse in Sauerstoff.

Rezipient $v_r = 10$, $v_0 = 10{,}7$, $K_{O_2} = 10{,}12$, $K_{CO_2} = 17{,}34$.

Bei 25° 30′ Sauerstoff durchgeleitet. Gasrest in 7 ccm des Sauerstoffs vor dem Versuch: 0,02 ccm. Prozentische Zusammensetzung des Gasraums nach 60′ Bestrahlung (150 Kerzen, 4 cm): Stickstoff im Analysenapparat 7,02 ccm; Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe 14,01 ccm; eingesaugt 6,99 ccm; nach Absorption durch Kalilauge und Hydrosulfit 7,04 ccm; Gasrest also 0,02 ccm.

c) Zusammenfassung. Mit 0,4 ccm = $18 \cdot 10^{-6}$ Molen Extra-Sauerstoff müßten $9 \cdot 10^{-6}$ Mole Ammoniak erscheinen nach der Gleichung

$$HNO_2 + H_2O = NH_3 + 2\,O_2\,,$$

während nur $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ Mole, das heißt $^1/_3$ dieser Menge nachgewiesen wurden.

Würden 70% des Extra-Sauerstoffs der Reaktion

$$2\,N_2O_5 = 2\,N_2 + 5\,O_2$$

entstammen, so müßten $0{,}4 \cdot \frac{70}{100} \cdot \frac{2}{5} = 0{,}11$ ccm Stickstoff entwickelt werden, während der Gasrest um sicher weniger als 0,01 ccm zunahm.

Nr. 35. **Bestrahlung narkotisierter Zellen in Nitratgemisch.**

Suspensionsflüssigkeit: $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Tabelle XXXI.

	Versuch I [1]		Versuch II [1]	
	dunkel	hell	dunkel	hell
Barometerstand bei Schluß der Hähne . . . . . mm Hg	757	757	762	762
Stickstoff i. Analysenappar. ccm	7,12	6,85	6,89	6,92
Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe . . . . . ccm	13,13	13,01	13,42	13,42
Eingesaugt . . . . . ccm	6,01	6,16	6,53	6,50
N. Absorption d. Kalilauge ccm	12,96	12,91	13,20	13,28
N. Absorption d. Hydrosulfit ccm	11,92	11,66	12,10	11,99
CO_2 . . . . . ccm	0,17	0,1	0,22	0,14
CO_2 . . . . . %	2,83	1,62	3,37	2,15
O_2 . . . . . ccm	1,04	1,25	1,10	1,29
O_2 . . . . . %	17,3	20,3	16,85	19,85
N_2 . . . . . %	79,9	78,1	79,8	78,0
x_{CO_2} . . . . . ccm	+0,47	+0,27	+0,56	+0,36
x_{O_2} . . . . . ccm	−0,37	−0,039	−0,41	−0,083
Extra—CO_2 . . . . . ccm	0,1	0,23	0,15	0,28

[1]) Für Versuch I und II verschiedenes Zellmaterial.

Digitized by Google

Eine Stammsuspension in $^n/_{10}$-$NaNO_3$ wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt und direkt vor Beginn einer Messung mit dem gleichen Volumen $^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{50}$-HNO_3, 0,026% Phenylurethan vermischt. Je 10 ccm Zellsuspension in den Rezipienten eingefüllt, für den

$$v_P = 10,\ v_G = 10,7,\ K_{O_2} = 10,12,\ K_{CO_2} = 17,34.$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Lichtquelle: $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampe, 150 Kerzen, in 4 cm Entfernung.

Gasanalysen: Tabelle XXXI.

Nr. 36. Bestrahlung narkotisierter Zellen in Nitrat- und Sulfatgemisch.

Suspensionsflüssigkeiten:

$^n/_{10}$-$NaNO_3$, $^n/_{100}$-HNO_3, 0,013% Phenylurethan und $^n/_{10}$-Na_2SO_4, $^n/_{100}$-H_2SO_4, 0,013% Phenylurethan.

Suspensionsdichte: 0,2 ccm Zellen: 10 ccm.

Darstellung der Suspensionen, wie in Protokoll 35. Je 10 ccm Suspension in den Rezipienten, für den

$$v_P = 10,\ v_G = 10,7,\ K_{O_2} = 10,12,\ K_{CO_2} = 17,34.$$

Bei 25° bis zur Sättigung Luft durchgeleitet. Zusammensetzung der Gasmischung vor dem Versuch: 0% Kohlensäure, 20,9% Sauerstoff, 79,1% Stickstoff.

Lichtquelle: $^1/_2$-Watt-Metallfadenlampe, 150 Kerzen, in 4 cm Entfernung.

Gasanalysen:

Tabelle XXXII.

Gemisch	Nitrat hell	Sulfat hell	Nitrat dunkel
Barometerstand b. Schluß d. Hähne mm Hg	758	757	757
Stickstoff im Analysenapparat . . . ccm	7,07	6,93	7,05
Gesamtvolumen nach Einsaugen der Gasprobe . . . . . ccm	13,82	13,58	13,60
Eingesaugt . . . . . ccm	6,75	6,65	6,55
Nach Absorption durch Kalilauge . . ccm	13,70	13,58	13,39
Nach Absorption durch Hydrosulfit . ccm	12,34	12,19	12,30
CO_2 . . . . . ccm	0,12	0	0,21
CO_2 . . . . . %	1,8		3,2
O_2 . . . . . ccm	1,36	1,39	1,09
O_2 . . . . . %	20,2	20,9	16.6
N_2 . . . . . %	78	79,1	80,2
x_{CO_2} . . . . . ccm	+0,31	0	+0,53
x_{O_2} . . . . . ccm	−0,05	0	−0,44
Extra—CO_2 . . . . . ccm	0,26	0	0,09

Digitized by Google

Eine mikroskopische Überführungsmethode.

Studien über Eiweißreaktionen. I.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenhygiene zu Hamburg.)

(Eingegangen am 3. Juli 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Mit Rücksicht auf die große kolloidchemische Bedeutung elektrischer Überführungsversuche sei es gestattet, an dieser Stelle die Methode zu schildern, die sich in einer Reihe von Untersuchungen (die demnächst veröffentlicht werden sollen), durch ihre Einfachheit, Feinheit und rasche Ausführbarkeit besonders gut bewährte.

Die kataphoretische Wanderung von Zellen wurde schon wiederholt mikroskopisch beobachtet (Höber, Lillie, Commandon, J. Traube u. a. m.), in der reinen Kolloidchemie aber hat sich diese Methode der Überführung, wie naheliegend auch der Gedanke sein mag, nicht eingebürgert.

Die von uns verwendete Methode war folgende: ein Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit wurde zwischen Deckglas und Objektträger im Mikroskop (Zeiß Okul. 4, Obj. D), je nach Bedarf mit Paraboloidkondensor (Zeiß) oder Abbes Kondensor eingestellt, sodann wurde von den seitwärts gerichteten Ecken des quer aufgelegten Deckglases rechts und links schmale Flüssigkeitsbrücken von verflüssigtem, durch 10% NaCl leitend gemachtem Agar gezogen. An diese Agarbrückchen wurden nun 0,5—1 cm weit vom Deckglas die unpolarisierbaren Elektroden angelegt, und der 110 Volt Gleichstrom der Stadtleitung wurde bei gleichzeitiger mikroskopischer Beobachtung der Wanderungsrichtung wiederholt geöffnet und geschlossen

Digitized by Google

Eine derartige Feststellung dauert kaum einige Sekunden, und jede Bewegung der optisch auflösbaren Kolloide läßt sich auf diese Weise genauestens verfolgen.

Über die Einzelheiten der Ausführung sei folgendes bemerkt:

1. Der zu untersuchende Tropfen sei genügend groß, so daß er am Rande des Deckglases etwas frei hervortritt, denn sonst wird der Agar durch Capillarität leicht in größeren Mengen unter das Deckglas gesogen.

2. Womöglich soll die Konzentration der Elektrolyte nicht 0,1 n überschreiten, da bei höherer Leitfähigkeit des Dispersionsmittels die Wanderung oft undeutlich wird.

3. Zur Beobachtung bedient man sich am besten eines Okularfadenkreuzes, um einen festen Anhaltspunkt zur Beurteilung der Bewegungen zu haben[1]).

4. Man durchschaue bei der Beobachtung durch Senken und Heben des Mikroskoptubus die ganze Dicke des Tropfens. Besonders bei feinen Suspensionen sieht man neben der Hauptwanderungsrichtung Teilchen

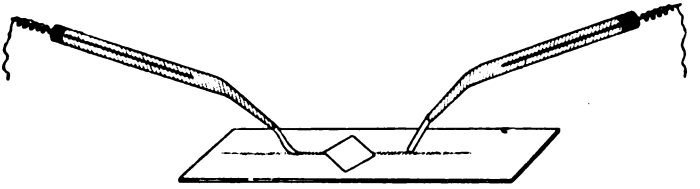


Abb. 1.

dicht am Deckglas oder Objektträger in dünner Schichte in entgegengesetzter Richtung wandern. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich durch das Zurückschleichen des durch die Kolloidteilchen mitgeschleppten Wassers bedingt, das einzelne disperse Teilchen mitreißt, was bei flüchtiger Beobachtung eine falsche Wanderungsrichtung vortäuschen kann.

5. Die Form der unpolarisierbaren Elektroden ist Geschmackssache. Bei den genannten Untersuchungen hatte sich folgende Form gut bewährt (Abb. 1): Zwei Glasröhrchen wurden an einem Ende etwas gebogen und ausgezogen, und sodann mit einem Wollfaden ausgestopft, der am schmalen Ende frei heraushing, um die Verbindung mit dem Agar herzustellen. Anlehnend an die Vorschrift der Depolarisation von Michaelis[2]) wurde das eine Rohr mit konzentrierter $CuCl_2$-Lösung durchtränkt, und als Kathode ein Kupferstab eingeführt. In das andere mit NaCl durchtränkte Rohr wurde als Anode ein Silberstäbchen eingelegt. (Man kann einige Krystalle $CuCl_2$ bzw. NaCl mit dem Wollfaden als Reserve noch in

[1]) Sehr gute Dienste leistete die M. Mayersche Lichtschutzkappe. Besonders bei ultramikroskopischer Beobachtung wurde dieser einfache Apparat unentbehrlich.

[2]) Michaelis, L., Die Wasserstoffionenkonzentration. Springer, Berlin 1914. S. 192.

Digitized by Google

das Röhrchen einstopfen.) Die breiten Enden der Röhrchen können mi Siegellack verschlossen werden. Die heraushängenden Fäden tauchen außer Gebrauch in starke Kochsalzlösung.

Der größte Mangel dieser Methode ist der, daß diese sich nur bei optisch auflösbaren Systemen verwenden läßt. In vielen Fällen kann man sie aber durch einen Kunstgriff auch für optisch unauflösbare homogene hydrophil-kolloidale Systeme geeignet machen: man versetzt sein Kolloid mit einer geringen Menge reiner Tierkohle und bestimmt nun die Wanderungsrichtung der letzteren.

Unsere Kohle (Mercks Carbo sang. med.) zeigte auch selber eine wohlausgeprägte anodische Wanderung[1]). Durch anorganische Elektrolyte läßt sich jedoch diese Ladung der Kohle kaum beeinflussen; die Kohle wurde selbst in 0,1 n $CuCl_2$ oder $AlCl_3$ nicht umgeladen, ebensowenig in einem Acetatregulator von p_H 3. Die Adsorption der Kohle ist also, wie Michaelis und Rona[2]) feststellten, eine apolare, hingegen ist die Affinität kohlenreichen Verbindungen gegenüber eine hohe [Michaelis und Rona[3])], so daß die Kohle in Eiweiß versetzt, dessen Wanderungsrichtung annimmt. Die, durch diese mikroskopische Methode bestimmte isoelektrische Konstante des Caseins, Gelatins und Serumalbumins wurde zur Prüfung der Methode mit der makroskopisch ermittelten verglichen und identisch gefunden.

Von den Vorteilen beider Methoden sei noch auf die geringe Menge des nötigen Untersuchungsmaterials hingewiesen. Im Notfalle genügen Bruchteile eines Kubikzentimeters eines gegebenen Kolloids zur Ermittelung des isoelektrischen Punktes. Konzentriertere kolloidale Lösungen können entsprechend verdünnt werden.

---

[1]) Bei dieser Methode der Beobachtung findet man überhaupt kaum elektroneutrale Körper unter den genügend weitgehenden dispergierten Substanzen.

[2]) Diese Zeitschr. **102**, 268. 1920.

[3]) Diese Zeitschr. **97**, 57. 1919.

Digitized by Google

Die Wirkung der Elektrolyte auf das Serumalbumin.

Studien über Eiweiß-Reaktionen. II.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenhygiene zu Hamburg.)

(Eingegangen am 3. Juli 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

h = Wasserstoffionenkonzentration $[H^{\cdot}]$ [1]),
IP = Isoelektrischer Punkt [1]),
AP = Anelektrischer Punkt,
Esp = Entladungsspannung.

Im Bestreben, unter einfachen Versuchsbedingungen an besser charakterisierbarem Versuchsobjekte dem Verständnis der Elektrolytwirkung näherzutreten, wurde die Wirkung der Elektrolyte auf das Serumeiweiß untersucht. Als Material diente das mit destilliertem Wasser auf das 15fache verdünnte, unter Toluol im Eisschrank in Kollodiumhülsen bis praktischer Salzfreiheit dialysierte Serumalbumin des Pferdes, und zwar sowohl in nativem wie auch in denaturiertem Zustande [2]). Das denaturierte Albumin wurde durch Eintauchen des salzfreien Eiweißes für einige Zeit in siedendes Wasser hergestellt. Das auf diese Weise gewonnene Präparat ist eine weiße, milchige Flüssigkeit, die sich im Ultramikroskop (Paraboloidkondensor, Obj. D, Okul. 4 von Zeiß) in feinste hellglänzende Körnchen vollkommen auflösen läßt, die im elektrischen Potentialgefälle eine wohlausgeprägte anodische Wanderung zeigen [3]).

---

[1]) Michaelis, diese Zeitschr. **103**, 225. 1920.

[2]) Michaelis und Rona, diese Zeitschr. **94**, 225. 1919.

[3]) Einige Präparate zeigten bei der Denaturierung bloß mäßige Opaleszenz, während andere mitunter spontan ausflockten. Derartige Präparate wurden ausgeschieden.

Digitized by Google

Die Versuche wurden stets so angestellt, daß in kleinen Reagenzröhrchen je 1 ccm des Elektrolyts (dessen Konzentration in Normalwerten angegeben ist) je 0,1 ccm des Albumins zugesetzt wurde.

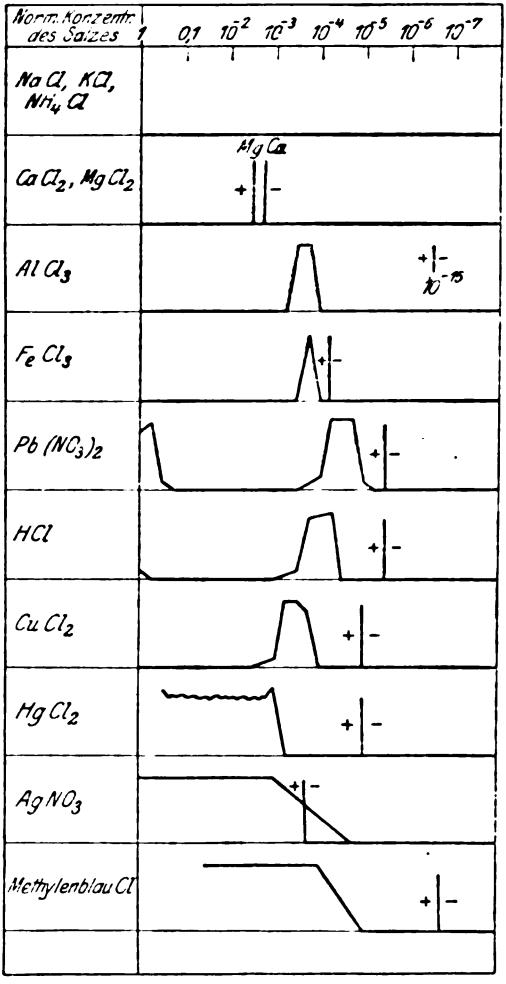


Abb. 1.

Unter den Wirkungen des Elektrolyts waren für uns besonders zwei von Interesse: die Flokkung und die Wirkung auf die Wanderungsrichtung des Eiweißes. Erstere wurde nach 15 Minuten und 24 Stunden makroskopisch, letztere nach einer Viertelstunde ultramikroskopisch festgestellt[1]).

Unsere meisten Versuche zeigen den Mangel, daß bei ihnen die k nicht definiert und somit eine Konkurrenz der H nicht ausgeschlossen ist. Es wurde diesem Umstande aus dem Grunde keine größere Beachtung geschenkt, weil bloß relative Werte erstrebt wurden und alle Versuche unter den gleichen Versuchsbedingungen angestellt waren. Die bei konstanter neutraler Reaktion wiederholten Probeversuche ergaben keine wesentlich verschiedenen Resultate.

[1]) Näheres über die Technik dieser Versuche s. diese Zeitschr. **110**, 116. 1920. „Eine mikroskopische Überführungsmethode".

Digitized by Google

Das denaturierte Albumin. Die Resultate dieser Versuche sind in der Abb. 1 graphisch dargestellt. Die Kurve gibt die Flockung, der vertikale Strich den Wendepunkt der Wanderungsrichtung, der der Kürze halber *AP* genannt sein mag. Rechts von diesem wanderte das Fiweiß anodisch, links von diesem kathodisch. An der Abscisse sind die steigenden Elektrolytverdünnungen aufgetragen, die Ordinate zeigt in willkürlicher Maßeinheit die Größe der Flockung. Die Höhepunkte der Kurven waren hier bei allen Elektrolyten totale Fällungen. Die Flockungen lagen in allen Parallelversuchen konstant bei denselben Verdünnungen des Elektrolyts. Die Umladungswerte zeigten einige Variation.

Das auffallendste an diesen Resultaten ist die Unabhängigkeit des Flockungsmaximums vom *AP*. Beide Punkte liegen bei allen Elektrolyten bei verschiedener Konzentration, und zwar liegt bei den untersuchten Ionenkombinationen stets der *AP* bei den höheren Verdünnungen. Dies ist auch bei H der Fall, auch bei Versuchen, die bei konstantem h bei Anwendung von Regulatoren angestellt wurden; auch bei diesen Versuchen fielen beide Werte mehr oder minder auseinander.

Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß wir es beim denaturierten Albumin nicht mit einem homogenen System zu tun haben, sondern daß dieses Kolloid aus zwei verschiedenen Phasen besteht, aus dem optisch sichtbaren, ausgefallenen Eiweiß, und von geringen Spuren anhaftender gelöster Eiweißstoffe, die den Kolloidschutz bilden, und derer Ausflockung das Ausfallen des gesamten Kolloids bedeutet, währenddessen die Wanderung des Eiweißkörnchens von den Qualitäten beider Phasen additiv abhängt. Der *AP* ist durch keine wohlausgeprägte Flockungszone charakterisiert.

Durchgehen wir nun die Reihe der Ionen, die in der Tafel nach der *Esp* des Kations geordnet sind, so sehen wir bei den fünf ersten Ionen höchster *Esp* keine Flockung, bei den ersten drei einwertigen Ionen auch keine Umladung. Hier scheint vielmehr die Wirkung des Anions geringerer *Esp* zu überwiegen, so, daß wir hier an Stelle der Umladung eher eine Erhöhung der negativen Beladenheit vorfinden[1]).

[1]) Die *Esp* dieser Ione sind nach Wilsmore und Ostwald, in absoluten Potentialen ausgedrückt, folgende:

Digitized by Google

Diese Erhöhung der negativen Beladung wurde auf zwei Wegen festgestellt: 1. durch die Ermittelung der Wanderungsgeschwindigkeit im Potentialgefälle. (Die Versuche wurden in besonderen Kammern angestellt, um unter konstanten Bedingungen zu arbeiten.) Das Eiweiß wurde mit 1,0 n. NaCl versetzt, sodann nach einiger Zeit das Gemisch mit dem 15 fachen destillierten Wasser verdünnt und die Wanderungsgeschwindigkeit sogleich und in nachfolgenden kurzen Zwischenräumen bestimmt. Diese gab folgende Werte $^1/_{145}$, $^1/_{180}$, $^1/_{200}$, $^1/_{235}$ cm/sek. In dem Maße also, wie das NaCl vom Eiweiß abgegeben wurde, verlangsamte sich seine Wanderungsgeschwindigkeit. Da die Masse des Eiweißes bei dem Versuche relativ sehr gering war, kann die Verlangsamung der Geschwindigkeit ungezwungenerweise nicht durch die Erhöhung der Leitfähigkeit der Flüssigkeit durch das abgegebene Kochsalz allein erklärt werden. Die endgültige Geschwindigkeit war also bei NaCl $^1/_{235}$, bei NH_4Cl unter gleichen Bedingungen $^1/_{220}$, bei KCl $^1/_{130}$ cm/sek. Dieser hohe Wert bei KCl ist ein Befund, für den die Erklärung nicht gefunden werden konnte

Die zweite Methode, mit der die Wirkung des NaCl auf die Ladung untersucht wurde, war die Ermittelung des umladenden Grenzwertes bei umladenden Kationen mit und ohne Gegenwart von NaCl. Verwendet man als Kation das hochwirksame H, so kommt die schwache Wirkung des NaCl nicht gut zur Geltung. Viel schönere Resultate erbrachten die Versuche mit $CaCl_2$, die zeigten, daß die umladende Wirkung von $CaCl_2$ bei seinen umladenden Grenzwerten durch NaCl gänzlich aufgehoben wird. Als bemerkenswertes Resultat haben die Versuche ergeben, daß das NaCl die umladende Wirkung des $CaCl_2$ eben in demjenigen Mengenverhältnis aufhebt, in dem die Mischungen dieser Salze auch für den höheren Organismus ungiftig bleiben, sich als physiologisch äquilibriert zeigen. Das Resultat eines derartigen Versuches bei Verwendung steigender h (sehr verdünnte Acetatregulatoren) ist in beistehender Tabelle dargestellt. Die Zeichen bedeuten die aus der Wanderungsrichtung bestimmte Ladung der Eiweißkörnchen

h	$4{,}5 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-7}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	$1{,}8 \cdot 10^{-6}$	$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	$3{,}7 \cdot 10^{-6}$
Normalversuch	−	−	−	−	+	+	+
0,9% NaCl	−	−	−	−	±	+	+
0,02% $CaCl_2$	+	+	+	+	+	+	+
0,9% NaCl + 0,02% $CaCl_2$	−	−	−	−	+	+	+

Bei den folgenden Ionen, Mg und Ca, finden wir, wie gesagt, keine Flockung, bloß eine Umladung.

K	(2,92)	Al (0,999)	Cu −0,606
Na	(2,54)	Fe 0,63	Hg −1,027
Ca	(2,28)	Pb −0,129	Ag −1,048
Mg	(2,26)	H −0,277	Cl −1,694

Wilsmore, Zeitschr. f. physikal. Chemie **35**, 291. 1900; Wilsmore und Ostwald, W., Zeitschr. f. physikal. Chemie **36**, 91. 1901.

Digitized by Google

Bei $AlCl_3$ ist der umladende Grenzwert außerordentlich hoch (10^{-15} n). Da hier die Eiweißkörnchen scheinbar durch ein einziges Ion umgeladen werden[1]), findet man bei feiner abgestuften Elektrolytreihen stets eine wohlausgeprägte Flockung, bedingt durch die Umladung der halben Zahl der Eiweißkörnchen im Gegensatz zu den noch unumgeladenen, negativen Teilchen, die mit ersteren zusammenballen[1]).

Bei $FeCl_3$ ist der umladende Grenzwert merkwürdigerweise sehr niedrig.

Bei Pb sieht man eine bereits von Pauli[2]) beschriebene zweite Flockungszone. Dieselbe ist andeutungsweise auch bei H[3]) und Hg vorhanden.

Von ganz besonderem Interesse ist die Kurve des H. Diese zeigt nämlich ganz dieselben Eigentümlichkeiten, die wir auf Grund der *Esp* in der Reihe der Ionen erwarten können. Eine Sonderstellung ist in keiner Richtung erkennbar.

Die Kurve des $CuCl_2$ ist analog der des H und zeigt keine besonderen Eigentümlichkeiten.

Die zwei letzten Ionen geringster *Esp* zeichnen sich durch die fehlende bzw. mangelhafte Auflösung oberhalb des Flockungsoptimums aus. Bei Hg ist die geringe Auflösung in einer besonders lockeren Fügung des Niederschlages erkennbar. Bei Ag fehlt scheinbar diese Auflösung ganz. Bei diesem Ion ist der ansteigende Ast der Flockungskurve besonders flach: der Niederschlag ist proportional der zugesetzten Ag-Menge. Die chemische Bindung zwischen Eiweiß und Ag ist besonders fest. Hat man den Überschuß des Ag durch 1—2tägige Dialyse entfernt, so gibt das Eiweiß kein Ag mehr ab und zeigt keine chemischen Reaktionen des Silbers (kein Niederschlag mit Cl, keine Reduktion mit Formalin oder Hydrochinon)[4]). Umladung und Flockung fallen bei diesem Ion annähernd zusammen.

---

[1]) Siehe Zeitschr. f. physik. Chem. 1920. („Eine Methode ... usw.")

[2]) Hofmeister, Beiträge 3, 223. 1903.

[3]) Bei H mag diese Flockung identisch sein mit der von Pauli und Handowsky konstatierten plötzlichen Viskositätsabnahme bei den höchsten h. (Diese Zeitschr. 18, 340. 1909.) Von Rona und Michaelis wurde beim Edestin eine analoge Fällung erzielt.

[4]) Dieser Unterschied den Befunden von Galeotti gegenüber mag seinen Grund in der Denaturierung haben (Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 492, 1904).

Digitized by Google

Das native Albumin. Von besonderem Interesse schien die Untersuchung des nativen Albumins, da hier nicht mit der Möglichkeit zweier verschiedener Phasen gerechnet werden mußte. Die Versuche wurden in gleicher Weise angestellt. Ihre Resultate sind an der Abb. 2 dargestellt.

Das native Albumin zeigt im allgemeinen eine geringere Tendenz zum Ausflocken, wofür zur Erreichung der Flockungsmaxima um einiges höhere Elektrolytenkonzentrationen angelegt werden müssen[1]). Die Flockungskurven sind bedeutend niedriger.

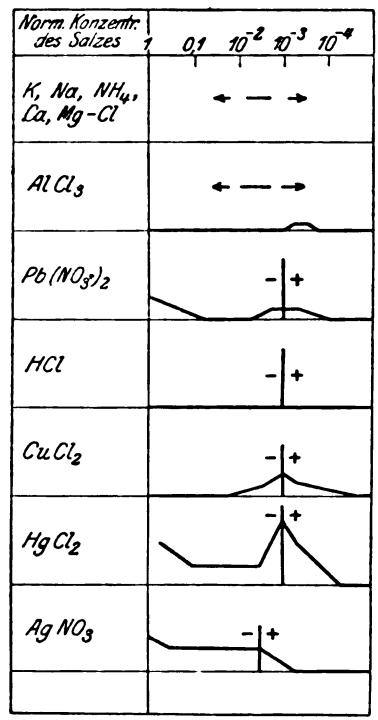


Abb. 2.

Der wesentlichste und wichtigste Unterschied dem denaturierten Albumin gegenüber ist der, daß hier außer bei $AlCl_3$ bei allen Salzen der *AP* mit dem Flokkungsmaximum zusammenfällt, daß also bei allen Kationen geringerer *Esp* sich dieselbe Regelmäßigkeit zeigt, die durch Michaelis für das $H^{\cdot}$ bei der Aufstellung der Theorie des *IP* bei den verschiedenen Ampholyten festgestellt wurde[2]).

Durch $AlCl_3$ wird das Eiweiß selbst bei 0,1 n Elektrolytenkonzentration nicht umgeladen[3]). Auch die Flocken wanderten bei $AlCl_3$ im ganzen Flockungsbereiche anodisch.

[1]) Dieser Umstand läßt vermuten, daß der supponierte gelöste Anteil des denaturierten Albumins etwas vom nativen Alb. qualitativ Verschiedenes sei.

[2]) Die Wanderungsrichtung wurde aus der Wanderung der Flocken festgestellt, nachdem wir uns überzeugt haben, daß beim Kasein die Flocken oberhalb des *IP* kathodisch, unterhalb desselben anodisch wandern. Außerdem wurden, wo es noch wegen Mangel an Flockung nötig war, Überführungsversuche mit Kohlenadsorption angestellt.

[3]) Dieser Umstand läßt den zunächst noch experimentell zu prüfenden Gedanken aufkommen, daß die Flockung beim Al hier, ebenso wie beim denat. Alb. gar nicht eine der Flockung bei den anderen Ionen analoge Erscheinung sei.

Digitized by Google

Die fünf ersten Ione höchster Esp. zeigen weder Flockung noch Umladung.

Beim H ist die Umladung mit keiner sichtbaren Fällung verbunden, immerhin wissen wir aus der Literatur des *IP*, daß der Wendepunkt der Wanderungsrichtung stets mit dem Löslichkeitsminimum zusammenfällt, auch wenn der *IP* durch keine sichtbare Flockung charakterisiert ist. Weiterhin ist auch aus der Literatur des *IP* bekannt, daß der Wendepunkt der Wanderungsrichtung homogener Ampholyte stets den Wendepunkt der elektrolytischen Dissoziation bedeutet, oberhalb dessen der Ampholyt als vorwiegend Kation, unterhalb dessen der vorwiegend Ampholyt als Anion vorhanden ist.

Es liegt kein Grund vor, die Umkehr der Ladung im Flockungsoptimum auch bei den anderen Ionen auf andere Weise erklären zu wollen. Hier, bei diesen Ionen scheinen dieselben Regelmäßigkeiten zu herrschen wie beim H', und es besteht die Hoffnung, die Regelmäßigkeiten, die von Michaelis und seinen Mitarbeitern für das H' festgestellt wurden, auch auf diese anderen Ione geringer *Esp* übertragen zu können.

Überlegen wir uns auf Grund der Ionenlehre, was wir bei dem Zusammentreffen eines Elektrolytenions mit dem Eiweißion zu erwarten haben, so scheint die Umkehr der Dissoziation bei allen Ionen geringer *Esp* einer einfachen Deutung zugänglich.

Nach der Aussprache von Nernst ist das Ion eine gesättigte chemische Verbindung des Atoms mit dem Elektron. Soll also zwischen zwei Ionen eine chemische Verbindung zustande kommen, so muß zuerst die Verbindung der Atome mit den Elektronen gelöst werden, bevor sich Atom mit Atom und Elektron mit Elektron verbinden kann. $Ag\oplus + Cl\ominus = AgCl + (\overline{+-})$.

Es stehen sich also zwei Größen gegenüber: die Affinität beider Elektrone + Affinität beider Ione einerseits, die Summe der Affinitäten der Atome zu den Elektronen andererseits. Ist die Summe der ersteren größer als die der letzteren, so wird sich Atom mit Atom und Elektron mit Elektron verbinden. Ist die Summe der letzteren Affinitäten eine größere, so bleibt die Verbindung zwischen Atom und Elektron bestehen, i. e. es kommt keine chemische Reaktion zustande[1]).

[1]) S. Abegg und Bodländer, Zeitschr. f. anorg. Chemie **20**, 253. 1899 In dieser grundlegenden Arbeit wird die Affinität der Elektrone

Digitized by Google

Wird also das Eiweißanion mit einem Kation geringer *Esp* (d. h. geringer Elektronenaffinität) versetzt, so vereinigt es sich mit diesem bei gleichzeitigem Austausch der Ladungen zum undissoziierten Molekül, das unter den drei Formen des Eiweißes (Anion, Kation, Molekül) am wenigsten löslich ist.

Das Eiweißmolekül hat eine gewisse, durch die Dissoziationskonstante charakterisierbare Tendenz zur elektrolytischen Dissoziation, und zwar sowohl nach der sauren, wie auch nach der alkalischen Seite zu. Da bei dem Eiweiß gewöhnlich die saure die größere ist, so wird die Dissoziation der alkalischen Seite zu unterdrückt und das Eiweiß ist nun als Anion vorhanden: $OHAlb' \ldots H^{\cdot}$.

Wird nun das Eiweiß mit einem Ion geringer *Esp* versetzt, sei es ein Schwermetallion oder $H^{\cdot}$, so vereinigt es sich mit diesem bei stufenweiser Erhöhung der Konzentration dieses Ions nach und nach in stets höherem Betrage zur chemischen Verbindung, d. h. zum undissoziierten Molekül. Nun kann die Tendenz der basischen Seite zur Dissoziation zur Geltung kommen, das Eiweiß dissoziiert nun bei dieser Gruppe und ist nun vorwiegend als Kation vorhanden[1]). Bei diesem Wendepunkt der Dissoziation, der also bei einer gewissen charakteristischen Konzentration des Elektrolyten liegt, ist die Konzentration der undissoziierten Moleküle am größten und die Löslichkeit und Quellung des Eiweißes somit am geringsten.

Im Spezialfalle des $H^{\cdot}$ wird diese Konzentration nach dem Vorgange von Michaelis *IP* genannt, scheint aber bei allen Ionen geringer *Esp* in durchaus analoger Weise vorhanden zu sein. Ionen höherer *Esp*, d. h. mit höherer Affinität zum Elektron, haben keinen derartigen *IP*. Wird hingegen das Elektron vom Eiweiß besonders leicht abgegeben, so können natürlicherweise auch die Ionen höherer *Esp* mit diesem eine undissoziierte Verbindung eingehen und dieses somit seinem *IP* zuführen.

---

nicht genügend hervorgehoben. Die Reaktion zwischen beiden Ionen ist nicht von ihrer absoluten Affinität zu ihrem Elektron, sondern von dem obigen Unterschiede der Größe der Affinitäten abhängig.

[1]) Die Dissoziation des Eiweißes oberhalb des *IP* kann noch durch Nebenreaktionen beschleunigt werden: $OHAlbH + H^{\cdot} + Cl' = Cl' + AlbH + HOH$. (Das AlbCl ist infolge der hohen *Esp* des Cl weitgehend dissoziiert.) Ebenso auch $OHAlbCu + Cu + Cl + AlbCu + CuOH_2$. Bei Säuren ist die Dissoziation noch durch die Erniedrigung der Konzentration der OH' bei Säurezusatz erleichtert.

Digitized by Google

So scheinen z. B. die Globuline eine geringere Affinität zum Elektron zu haben, von denen aus den Untersuchungen von Michaelis und Rona[1]) bekannt ist, daß sie sich schon durch relativ geringe Konzentration von $H^{\cdot}$ entladen lassen, d. h. daß ihr *IP* relativ niedrig liegt ($3{,}6\ 10^{-6}$). Einige Versuche wurden auch an diesem Material angestellt, das nach dem Vorgange von J. Loeb[2]) durch Fällung im *IP* durch $H^{\cdot}$ hergestellt wurde. Das auf diese Weise gewonnene, wiederholt gewaschene und in destilliertem Wasser aufgeschwemmte Globulin zeigte bei neutraler Reaktion (sehr verdünnter Acetatregulator) eine schwache, nicht ganz eindeutige anodische Wanderung. Dieses Globulin wurde nun auch schon von den zwei- und dreiwertigen Ionen höherer *Esp* umgeladen und zeigte schon bei einer 0,001 n $AlCl_3$- und $CaCl_2$-Konzentration eine eindeutige kathodische Wanderung. Unseren obigen Betrachtungen gemäß würde dies heißen, daß in bezug auf Globulin auch schon diese Ionen ihren *IP* haben. Nicht nur die Flocken, sondern auch der gelöste Anteil wanderte bei Anwesenheit dieser Ione kathodisch, was durch Überführungsversuche mit der Kohle festgestellt wurde. Natürlicherweise mußten bei diesen Versuchen höhere Elektrolytenkonzentrationen angelegt werden, um einen größeren Betrag von Globulin in Lösung zu bekommen (0,1—0,01 n).

Zusammenfassung.

1. Denaturiertes Albumin. Die einwertigen Kationen höchster Entladungsspannung haben weder fällende noch umladende Wirkung (K, Na, NH_4). Zweiwertige Kationen hoher *Esp* haben bloß umladende Wirkung (Ca, Mg). Die anderen Kationen geringerer *Esp* zeigen beide Wirkungen, die bei verschiedenen Konzentrationen liegen.

2. Beim nativen Albumin zeigen die Elektrolyte annähernd dieselben Wirkungen mit dem wesentlichen Unterschiede, daß bei diesem Material Umladung und Flockungsmaximum stets zusammenfallen.

3. Das $H^{\cdot}$ läßt sich mit den anderen Kationen einer einheitlichen Beurteilung unterziehen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **28**, 193. 1910.

[2]) Journ. of gen. Physiol. **1**, 237. 1918.

Digitized by Google

Untersuchungen über den Ablauf der alkoholischen Gärung der Hefe. II.

Von

Erich Köhler.

(Aus dem botanischen Laboratorium der Hochschule Weihenstephan.)

(Eingegangen am 3. Juli 1920.)

Mit 5 Abbildungen im Text

Einleitung. Im folgenden soll den bei der Gärung nachgewiesenen Schwankungen weiter nachgegangen werden. Wie aus einer früheren Mitteilung des Verfassers hervorgeht, verläuft der Gärungsprozeß nicht stetig, sondern ist bedeutenden Schwankungen unterworfen, die sich mit Hilfe der Gasblasenzählmethode leicht nachweisen lassen. Es sollen im folgenden die durch den Alkohol bedingten „kleinen" Schwankungen unberücksichtigt gelassen werden. Unser Interesse gilt den großen Schwankungen. Wodurch sind sie bedingt?

Der Gedanke liegt nahe, sie zur Alkoholwirkung in Parallele zu setzen und sie ebenfalls auf Veränderungen im Substrat zurückzuführen. Aber auch die Vorstellung, daß sie bedingt sein könnten durch das Verhältnis von Fermentverbrauch zu Fermentersatz, ist von vornherein nicht abzuweisen. Man könnte sich vorstellen, daß der Fermentersatz mit dem Fermentverbrauch nicht Schritt halten könne und daß damit notwendig eine Verringerung der Gärungsgeschwindigkeit eintreten müsse. Orientierende Versuche haben nun gezeigt, daß dem Faktor der Fermentrestitution kaum eine ausschlaggebende Bedeutung zukommt. Doch sind die Untersuchungen hierüber noch nicht abgeschlossen. Dagegen hat sich erwiesen, daß die Zuckerkonzentration einen Hauptfaktor darstellt. Wie schon für den Äthylalkohol nachgewiesen werden konnte, verläuft die Gärkurve auch beim Zucker mit steigender Konzentration unregelmäßig, in Zickzackform.

Digitized by Google

Die angewandte Methode ist denkbar einfach. Die Gärungen werden in (100 ccm-) Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas von annähernd gleicher Form und Größe ausgeführt. Die Gärungsgeschwindigkeit wird gemessen durch Feststellung der Gewichtsabnahme (CO_2-Verlust) mittelst einer Wage, die 0,01 g genau anzeigt. Die erste Wägung muß sofort nach Zugabe der Hefe zum Gäransatz ausgeführt werden. Die darauffolgenden Wägungen sind auf die Minute pünktlich vorzunehmen.

Tabelle I.

Laufende Nr.	Saccharose in %	Zeit der Wägung: ersten	Zeit der Wägung: zweiten	Gewichtsverlust in hundertstel Gramm: seit Beginn des Versuchs (8 Stunden) I	seit d. vorhergehend. Wägung (8 Std.) II	seit d. vorhergehend. Wägung (2 Std.) III	seit d. vorhergehend. Wägung (41 Std.) IV
1	6,17	8^h 10′	11^h 10′	28	38	34	127
2	6,46	8^h 13′	11^h 13′	31	42	37	149
3	6,76	8^h 15′	11^h 15′	35	42	48	156
4	7,06	8^h 17′	11^h 17′	33	42	42	166
5	7,35	8^h 20′	11^h 20′	31	46	40	184
6	7,64	8^h 22′	11^h 22′	31	50	46	180
7	7,93	8^h 25′	11^h 25′	29	50	44	191
8	8,23	8^h 28′	11^h 28′	34	49	47	199
9	8,50	8^h 30′	11^h 30′	33	44	46	212
10	8,82	8^h 32′	11^h 32′	36	51	47	214
11	9,11	8^h 34′	11^h 34′	34	50	48	224
12	9,41	8^h 37′	11^h 37′	36	52	49	231
13	9,70	8^h 39′	11^h 39′	34	52	52	241
14	10,00	8^h 42′	11^h 42′	37	52	54	248

Versuch mit gleichen Mengen frisch gewaschener Weihenstephaner Betriebshefe und steigenden Mengen Saccharose. In 35 ccm Hefeaufschwemmung zugesetzt zu einer Lösung von 5,25 bis 8,5 g Saccharose (Merck) in 50 ccm Wasser. Näheres s. Tabelle I.

Da die Gärung von Anfang an bekanntlich infolge der fortgesetzten Alkoholanreicherung im Substrat kleinen Schwankungen unterliegt, können wir für unsere Zwecke brauchbare Werte erst nach einiger Zeit bekommen, wenn diese störenden Wirkungen des Alkohols sich nicht mehr bemerkbar machen. Daher nehmen wir die erste dem Ansetzen des Versuchs folgende Wägung erst nach 3 Stunden vor. In Abb. 1 (aus den Werten der Tabelle I konstruiert) erkennt man aus Kurve I (nach 3 Stunden) schon deutlich die unregelmäßige Wirkung des Zuckers. Noch deutlicher tritt dieser Vorgang in Erscheinung bei Kurve I + II (nach 6 Stunden) und Kurve I + II + III (nach 8 Stunden). Daß die Zickzacklinie sich nur immer auf einem Abschnitt der

Digitized by Google

Kurve klar abzeichnet, liegt daran, daß die Gärungsgeschwindigkeit mit steigender Zuckerkonzentration zunimmt und infolgedessen die theoretischen Höhen- und Tiefenpunkte streckenweise zwischen den durch Messung festgestellten Punkten zu suchen sind. Wie man sich die theoretische Kurve vorzustellen hat, zeigt Abb. 2. Darauf bedeutet die ausgezogene Linie die empirische, aus den Werten der Reihe III, Tab. I gewonnene Kurve, während der Verlauf der theoretischen Kurve durch die gestrichelte Linie wiedergegeben ist. Das mehr oder weniger deutliche Hervortreten der Zickzackkurve ist demnach von dem mehr oder weniger günstigen Zeitpunkt der Wägung abhängig. Lassen wir die Gärung genügend lange andauern, so verschwinden die Differenzen fast vollkommen. Wir finden also, daß der Zucker (Saccharose) im Prinzip die gleiche Wirkung entfaltet, wie wir sie früher für den Äthylalkohol feststellen konnten.

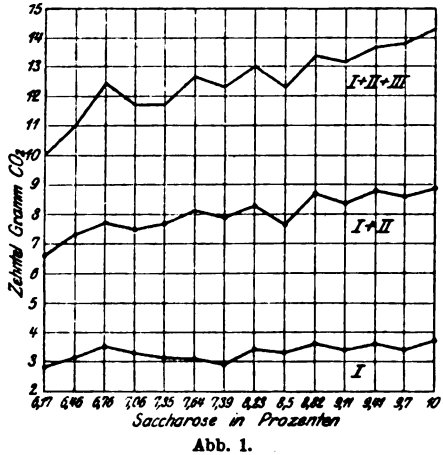


Abb. 1.

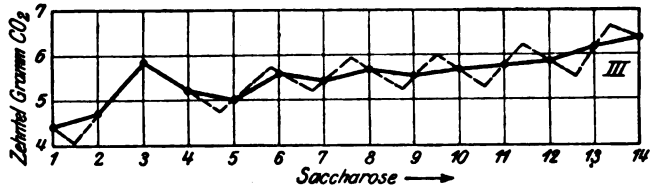


Abb. 2.

Daß es sich bei den im Vorhergehenden beschriebenen Schwankungen tatsächlich um Zuckerwirkung und nicht um Alkoholwirkung handelt, läßt sich durch den folgenden Versuch erhärten. Wie die Gärung von einer dauernden Zunahme der Alkoholkonzentration im Substrat begleitet ist, so ist sie von einer dauernden Abnahme der Zuckerkonzentration begleitet. Wie wir beim Alkohol demnach im Verlauf der Gärung eine Verschiebung der Kurve im Koordinatensystem nach links fordern mußten und auch nachweisen konnten, so müssen wir beim Zucker eine Verschiebung

Digitized by Google

Tabelle II.

Lfd. Nr.	Maltose in %	Gewichtsverlust in hundertstel Gramm: seit Beginn des Versuchs (1½ Std.) I	seit der vorhergehenden Wägung (1½ Std.) II	seit der vorhergehenden Wägung (16 Std.) III
1	0,63	3	2	11
2	0,94	6	5	13
3	1,25	8	9	11
4	1,56	10	9	17
5	1,87	16	10	22
6	2,18	19	16	21
7	2,50	19	18	25
8	2,81	23	20	29
9	3,13	25	25	26

der Kurve nach rechts finden. Letzteres ist auch tatsächlich der Fall, wie der folgende Versuch mit Maltose zeigt.

Versuch: Steigende Mengen Maltose von 0,63 bis 3,13%. Näheres s. Tabelle II.

Überträgt man die in der Tab. II eingetragenen Werte der aufeinanderfolgenden Wägungen in übereinanderliegende Koordinatensysteme, so erhält man das in Abb. 3 gegebene Bild. Die der Kurve III zugrunde liegenden Werte wurden zufällig in einem günstigen Zeitabschnitt gewonnen, in welchem Höhen- und Tiefenpunkte annähernd mit den empirischen Punkten zusammenfallen. Bei den Kurven I und II fallen sie dazwischen und wir müssen das Bild hier durch Eintragung der theoretischen Kurve ergänzen (auf der Abbildung gestrichelt). Man erkennt dann ohne wei-

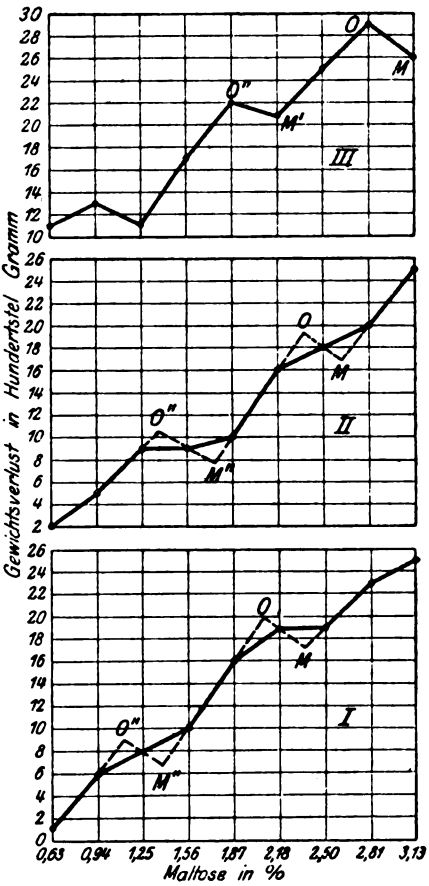


Abb. 3.

Digitized by Google

teres die Verschiebung der Höhenpunkte O und O″ und der Tiefenpunkte M und M″ nach rechts. Damit ist der Nachweis geliefert, daß der Zucker mit aufsteigender (und abnehmender) Konzentration die Gärung ganz charakteristisch beeinflußt. Höhen- und Tiefenpunkte wechseln regelmäßig miteinander ab. Die Kurven haben die Form von Zickzacklinien. Auch bei diesem Versuch zeigt sich wie beim vorhergehenden, daß, nach einer längeren Gärdauer, aus der Summe der Gewichtsverluste kein Bild mehr zu bekommen ist von der abwechselnden Wirkung verschiedener Konzentrationen. Die Höhen- und Tiefenpunkte verschwinden fast vollkommen (Abb. 4).

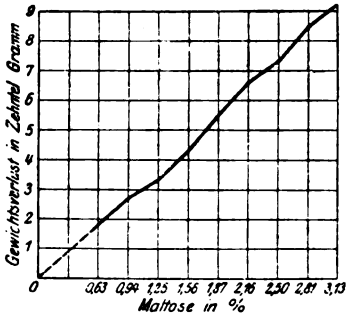


Abb. 4.

Die Wirkung des Mannit.

Versuch: Gleiche Mengen Hefe (25 ccm Hefeaufschlemmung), gleiche Mengen Saccharose (5 g) zu je 50 ccm Mannitlösung in steigenden Konzentrationen (zwischen $^1/_2$ bis $^1/_{256}$ molar). S. Tabelle III.

Tabelle III.

Mannit-m	Gewichtsverlust in Zehntel Gramm (nach 6 Stunden)
0	63
$^1/_{256}$	69
$^1/_{128}$	70
$^1/_{64}$	64
$^1/_{32}$	68
$^1/_{16}$	64
$^1/_8$	70
$^1/_4$	64
$^1/_2$	71

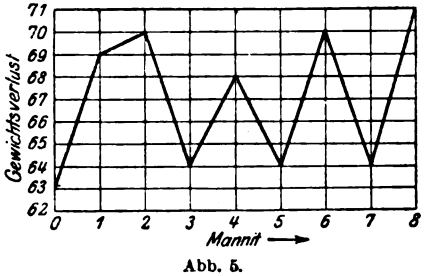


Abb. 5.

Trägt man die gewonnenen Werte in ein Coordinatensystem ein, so erhält man eine Zickzackkurve, deren weitgehende Ähnlichkeit mit der Alkohol- und Zuckerkurve sofort in die Augen springt (Abb. 5).

Es scheint sich hier eine Gesetzmäßigkeit von umfangreicher Gültigkeit zu enthüllen. Ich möchte die Erscheinung mit dem nicht sehr wissenschaftlich anmutenden, aber doch anschaulichen Ausdruck „Zickzackphänomen" belegen. Untersuchungen auf breiterer Basis werden die Reich- und Tragweite dieses Phänomens bestimmen müssen.

Digitized by Google

Der Ursprung des anaphylaktischen Schockes.

Von

J. Forssman.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 7. Juli 1920.)

Seit der Entdeckung der Anaphylaxie ist der Mechanismus des Schockes Gegenstand reger Diskussion gewesen und, wie aus der Literatur ersichtlich ist, findet noch keine allgemeine Übereinstimmung betreffs des Problems statt. Mir wenigstens scheint allerdings durch die Arbeiten der letzten Jahre doch soviel sichergestellt zu sein, daß die Reaktion zwischen Antikörper und Antigen, die nach der allgemein geltenden Auffassung die Grundlage des Schocks bildet, intracellulär und also nicht im Blute vonstatten geht. Dann geht es auch aus den Anaphylaxieversuchen mit isolierten Organen hervor, daß die anaphylaktischen Antikörper wahrscheinlich in beinahe allen Organen vorkommen und daß demnach auch wahrscheinlich alle Organe bei dem Schock sich beteiligen können, ob aber in Wirklichkeit alle oder nur einige wenige es tun, davon weiß man nichts. Beim Meerschweinchen bekommt man ja durch die schnell einsetzenden und heftigen Lungensymptome den Eindruck als ob die Lungen das Hauptzentrum des Prozesses wären, aber man ist sich noch nicht darüber einig, ob die Lungensymptome zentraler oder peripherer Herkunft sind, noch weniger ob die Giftbildung — wenn überhaupt von einer Giftbildung die Rede ist — primär ist oder das Gift von anderswo herbeigeführt wird; daß das Gehirn auch affiziert wird, ist durch die Krämpfe und durch die plötzlichen Temperaturschwankungen offenbar, aber ob dies primär oder sekundär geschieht, ist ebenso unsicher wie die Bedeutung der veränderten Leberfunktion für den Schock, die unter anderem das Wegfallen der Harnstoffbildung zur Folge hat.

Digitized by Google

Neue Versuche sind also nötig um diese Fragen zu klären.

Es gibt nun auch eine Anaphylaxie beim Meerschweinchen, welche anderer Herkunft ist als die gewöhnliche, wo ja der Schock durch die Verbindung der im Organismus befindlichen, durch eine Erstinjektion von Antigen hervorgerufenen Antikörpern mit dem später reinjizierten Antigen zustande kommt. Diese andere Anaphylaxie sieht man, wenn man normale Meerschweinchen mit hammelhämolytischem Serum intravenös injiziert und hier entsteht der Schock dadurch, daß das normale, in den Organen befindliche Antigen mit Antikörpern, welche das Serum enthält, sich verbindet — also gerade das umgekehrte von dem, was wir bei der gewöhnlichen Anaphylaxieform haben, weshalb ich auch jene als die umgekehrte Anaphylaxie bezeichnet habe und unten bezeichne.

Man hat allerdings der Versuchsanordnung wegen Zweifel darüber geäußert, ob das, was man nach Injektion von hammelhämolytischem Serum beim Meerschweinchen sieht, wirklich der Anaphylaxie angehöre; das scheint mir aber durch folgende Tatsachen sichergestellt zu sein: 1. Durch die vollständige Übereinstimmung der hierbei auftretenden Symptome und Sektionsbefunde mit dem, was wir bei der gewöhnlichen Anaphylaxie sehen; 2. daß der schockerzeugende Stoff des hammelhämolytischen Kaninchenserums bei der Immunisierung von Kaninchen mit Hammelblut entsteht und als Antikörper bezeichnet werden muß; 3. daß derselbe Antikörper durch Meerschweinchenorganinjektionen bei Kaninchen erzeugt wird; 4. daß dieser Antikörper von den Meerschweinchenorganen auch spezifisch gebunden wird und 5. daß man auch bei der umgekehrten Anaphylaxie eine Antianaphylaxie durch untertödliche Dosen bekommt.

Mit einem hammelhämolytischen Kaninchenserum und normalen Meerschweinchen kann man also den anaphylaktischen Schock studieren, eine so einfache Versuchsanordnung wie man sie überhaupt wünschen kann; diese habe ich nun benutzt, um in den Mechanismus des Schockes einzudringen, und es sind die Resultate meiner diesbezüglichen Untersuchungen, welche ich hier vorlegen möchte.

Indessen, bevor ich dies tue, will ich die antianaphylaktischen Verhältnisse bei dieser, der umgekehrten Anaphylaxie zuerst besprechen. Die Kenntnis dieser ist nämlich notwendig, um

Digitized by Google

die Fragestellung meiner untenstehenden Versuche verfolgen zu können. Die Eigenart dieser Antianaphylaxie wird doch erst dann recht verstanden, wenn man sie im Vergleich mit derjenigen Antianaphylaxie sieht, welche bei der gewöhnlichen Anaphylaxie vorkommt. Deshalb werde ich auch hier eine Parallele zwischen diesen beiden Antianaphylaxieformen zeichnen.

Bekanntlich ist der Grad der Antianaphylaxie bei der gewöhnlichen Anaphylaxie sehr wechselnd, oft beinahe absolut, oft kaum zu spüren. Das hat u. a. Thomson[1]) hervorgehoben und durch seine Untersuchungen die Erklärung hierfür folgendermaßen gegeben. Die Antianaphylaxie hängt, wie allgemein angenommen wird, ab von einer partiellen Sättigung der im Körper befindlichen Antikörper durch die untertödliche Antigendosis, welche zu antianaphylaktischem Zwecke injiziert worden ist. Ist dabei der Antikörpergehalt des Tieres sehr gering, so wird von der injizierten Antigenmenge vielleicht ein so großer Teil der Antikörper gesättigt, daß nicht genug frei zurückbleibt, um einen anaphylaktischen Schock zusammen mit später injiziertem Antigen überhaupt zu erzeugen, in welchem Falle ja eine absolute Antianaphylaxie resultiert. Kommen dagegen sehr große Mengen Antikörper im Tier vor, so sättigt allerdings dieselbe Antigenmenge wie oben dieselbe oder vielleicht eine ein wenig größere Antikörpermenge, aber im Verhältnis zum totalen Antikörpergehalt des Tieres kann der gesättigte Teil verschwindend klein sein, und die restierende ungesättigte Antikörpermenge wird dann groß genug um mit beinahe der ursprünglichen Antigendosis den Schock zu bewirken; man vermag da kaum eine Verminderung der Sensibilität des Tieres oder mit anderen Worten kaum eine Antianaphylaxie zu entdecken. Und zwischen diesen Extremen gibt es alle möglichen Übergänge.

Bei der umgekehrten Anaphylaxie wird ja, wie schon oben gesagt, der Schock durch Zusammenwirken von im Meerschweinchenkörper befindlichem Antigen mit injizierten Antikörpern erzeugt. Da die Antigenmenge hierbei, wie die Untersuchungen von mir und allen denjenigen, welche meine hierhergehörigen Versuche nachgeprüft haben, erweisen, enorm ist und in allen Organen vorkommt, so würde man im Hinblick auf die obenerwähnten Verhältnisse bei der gewöhnlichen Ana-

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 25, 213.

Digitized by Google

phylaxie erwarten, daß kaum eine Antianaphylaxie hier aufgewiesen werden könnte. Denn durch eine untertödliche Antikörperdosis würde doch nur ein winziger Bruchteil der vorhandenen Antigenmenge gesättigt werden, wonach für Schockerzeugung durch neue Antikörperzufuhr die ganze übrige Antigenmenge noch zur Verfügung wäre. Und trotzdem ist das Vorkommen einer Antianaphylaxie leicht aufzuweisen, was Friedberger und Castelli[1]) als die ersten gemacht haben. Aber sie ist, und dies im Gegensatz zu der Antianaphylaxie bei der gewöhnlichen Anaphylaxie, nie so stark entwickelt, daß die antianaphylaktisierten Tiere zwei intravenös akut tödliche Dosen vertragen können, sondern immer schwächer, wie Fex und ich[2]) gezeigt haben. Und zudem haben wir erwiesen, daß diese Antianaphylaxie ebensogut aus $^1/_{35}$ einer intravenös, akut tödlichen Dosis wie aus einer Dosis, die in der nächsten Nähe der tödlichen Dosis liegt, emporwächst[2]).

Wie soll man sich dies erklären? So weit ich sehe, kann es nur verstanden werden, wenn man annimmt, daß unter dem befindlichen Antigen[3]) verschiedene Aviditätsgrade vorkommen. (Für die Immunitätslehre enthält eine solche Annahme ja nichts prinzipiell Neues; hier ist sie dadurch sehr plausibel, daß doch das Antigen in den verschiedenen Organen in verschiedenen Lösungen oder mit verschiedenen Kolloiden vermischt vorkommt.) Wäre nämlich alles hierhergehörige Antigen von derselben Avidität den Antikörpern gegenüber, so würde bei Injektion von steigenden Antikörpermengen ($^1/_{35}$—$^{34}/_{35}$ der akut tödlichen Dosis) oder bei wiederholten Antikörperinjektionen entsprechende, wachsende Mengen von Antigen abgesättigt und demnach auch der Grad der Antianaphylaxie gesteigert werden. Dieses ist aber, wie gesagt, nicht der Fall ist. Wenn man aber annimmt, daß das Antigen von wenigstens zwei verschiedenen Aviditätsgraden ist, wovon der eine, die große Masse, erst bei einer Antikörperkonzentration,

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 6.

[2]) Diese Zeitschr. 66.

[3]) Antigen und Antikörper bezeichnen hier und überall unten, wo nicht anders besonders gesagt wird, nur dasjenige in Meerschweinchenorganen befindliche Antigen, das bei dieser Anaphylaxie wirksam ist — also nicht andere auch in den betreffenden Organen vorkommende Antigene — und nur diejenigen Antikörper, welche mit dem Antigen reagieren, um den anaphylaktischen Shock zu erzeugen.

Digitized by Google

welche zwei akut tödlichen Dosen entspricht, in Reaktion tritt, während der andere, der kleinere Teil, schon bei niedrigerer Antikörperkonzentration reagiert, so werden die obengenannten Befunde leicht erklärlich. Nach Injektionen von einer Serummenge, welche ein Geringes weniger als zwei akut tödliche Dosen enthält, tritt dann nur das letztgenannte, das am meisten avide Antigen in Reaktion; und wenn, durch eine vorhergehende Antikörperinjektion ein nicht zu kleiner Teil von diesem Antigen abgesättigt worden ist, bleibt nicht genug davon frei übrig, um den Schock zu bewirken, und eine Antianaphylaxie tritt hervor, da die große freie, weniger avide Antigenmenge bei dieser geringen Antikörperkonzentration nicht in Reaktion treten kann. Sobald wir aber zwei akut tödliche Dosen oder mehr injizieren, reagieren auch diese Antigenmengen und der Schock wird ebenso kräftig bei vorher injizierten wie bei unbehandelten Tieren.

Wegen dieser Auseinandersetzungen und da, wie frühere Versuche erwiesen haben, alle untersuchte Organe des Meerschweinchens das betreffende Antigen enthalten, stellte ich mir diese Frage: Ist dasjenige Antigen, welches zusammen mit der einfachen akut tödlichen Serumdosis den Schock erzeugt, und durch dessen Absättigung die vorkommende Antianaphylaxie entsteht, in allen Organen verteilt oder kommt es nur in einem oder einigen Organen vor? Mit anderen Worten: tragen alle oder nur vereinzelte Organe zu demjenigen Schock bei, der durch eine einfache, akut tödliche Serumdosis ausgelöst wird?

Im Falle, daß alle die antigenhaltigen Organe beim Hervorrufen des Schockes nach Injektion der einfachen, akut tödlichen Dosis teilnehmen, muß es einerlei sein, wenn man das antikörperhaltige Serum in das eine oder andere Gefäß einspritzt; die Antikörper werden doch binnen einigen Sekunden den verschiedenen Organen zugeführt und treten in Reaktion mit dem Antigen. Wird dagegen der Schock nur von einem oder einigen Organen ausgelöst, so muß man erwarten, daß, wenn das antikörperhaltige Serum direkt durch die zuführenden Gefäße oder vielleicht direkt in die Organsubstanz des betreffenden Organs injiziert wird, der Schock durch eine viel winzigere Dosis hervorgerufen werden würde, als wenn man das Serum in ein vom genannten Organe entfernt liegendes Gefäß injiziert. In diesem Falle wird ja nämlich das Serum

Digitized by Google

durch die ganze Blutmenge verdünnt, bevor es das genannte Organ erreicht, während in jenem Falle es so konzentriert wie möglich dahin kommt; und — wie bei allen Reaktionen — so spielen ja auch bei den Immunreaktionen die Konzentration der reagierenden Substanzen eine hervorragende Rolle.

Um nun zwischen den beiden erwähnten Möglichkeiten zu entscheiden, bin ich auf den drei folgenden Wegen vorgegangen: 1. teils habe ich das hammelhämolytische, schockerzeugende Serum direkt in die Substanz der verschiedenen Organe, 2. teils in die zuführenden Gefäße der Organe injiziert und das Resultat mit dem Resultat von den intravenösen Injektionen derselben Dosen verglichen; 3. endlich habe ich geprüft, ob durch Exstirpation von Organen der Schock beeinflußt bzw. verhindert werden könnte. Wäre nämlich das am meisten avide, schon bei der einfach tödlichen Serumdosis wirksame Antigen in einem Organe lokalisiert, und würde dies Organ exstirpiert, so wäre damit eine Resistenz gegen die genannte Dosis geschaffen und damit auch ein Beweis geliefert, daß hierbei nur das betreffende Organ und nicht die übrigen Organe die Schockerzeugung bewirkten und daß von anderen Organen herrührende Symptome als sekundäre aufgefaßt werden müßten.

I. Direkt in die Substanz der Organe gemachte Injektionen von hammelhämolytischen Sera.

Ich gebe unten eine tabellarische Übersicht dieser Injektionen.

Betreffs der hier und auch in späteren Versuchen angewandten Sera möchte ich mitteilen, daß die Sera 423, 487, 591 und 704 gewöhnliche, durch Hammelblutinjektionen bei Kaninchen erzeugte hammelhämolytische Sera waren, welche einen hämolytischen Titer (reziproker Wert der minimalen, zusammen mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum 1 ccm 5proz. Hammelblut komplett lösender Dosis) von 20 000 bzw. 20 000, 33 000 und 50 000 hatten. Das Serum 570 war dagegen ein durch Pferdenierenninjektionen erhaltenes hammelhämolytisches Serum mit einem hämolytischen Titer von 3000.

Die minimalen, intravenös akut — d. h. in 5 bis 10 Min. — tödlichen Dosen wurden selbstverständlich bei jeder Versuchsreihe und für jede Verdünnung hier und in allen folgenden Versuchen genau austitriert. Um nicht die Tabellen unnötigerweise zu verlängern, sind dort nur die Resultate dieser Titrierungen, nicht die Titrierungen selbst angegeben.

Bei allen intravasalen Seruminjektionen in dieser Arbeit sind die bestimmten Serummengen mit 0,8% NaCl-Lösung bei 37° bis 1 ccm auf-

Digitized by Google

gefüllt und dieses Quantum dann in 5—7 Sekunden injiziert. Die Diagnose anaphylaktischer Schock ist aus den Respirationsstörungen des bekannten Typus, aus den Krämpfen und bei gestorbenen Tieren auch aus dem Lungenemphysem gestellt. Die Temperaturschwankungen der injizierten Tiere habe ich dagegen nur selten untersucht, sie waren für meinen Zweck belanglos und kommen ja zudem auch bei nicht anaphylaktischen Umständen vor, weshalb man sie als Diagnostikon für den anaphylaktischen Schock nicht allzu hoch schätzen kann.

Bei den Injektionen in die Leber und die Nieren wurden immer die genannten Organe bloßgelegt, um absolute Sicherheit zu bekommen, daß das injizierte Serum wirklich dem betreffenden Organ zugeführt wurde.

Tabelle I.

Tier Nr.	Injektionsort	Serum Nr.	Minimale, intravenös akut tödliche Dosis des Serums	Injizierte Dosis	Resultate
579	Lunge	570	0,12 ccm pro 100 g Tier	0,12 ccm pro 100 g Tier	Ein wenig schnellatmend, sonst nichts.
580	„	570	0,12 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	Dgl.
622	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,16 ccm „ 100 g „	Ohne Folgen.
623	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,85 ccm „ 100 g „	Schnellatmend; stirbt 10 Tage später an doppelseitiger Pneumonie.
695	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,85 ccm „ 100 g „	Ein wenig schnellatmend, sonst nichts.
582	Leber	570	0,12 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	O-Symptom. Injektion während Narkose.
698	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,08 ccm „ 100 g „	† in 5 Min. Typ. anaphylaxie.
699	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,08 ccm „ 100 g „	O-Symptome.
700	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	„
581	Niere	570	0,12 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	O-Symptome Injektion während Narkose.
588	Gehirn	570	0,12 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	Ruhig, keine Atmungsstörungen. Starb nach 12 Std. Keine Anaphylaxie.
578	„	570	0,12 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	Wie voriges Tier. Starb in 1 Std. Kl. Gehirnblutung.
717	„	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	Keine Anaphylaxie. Kleine Blutung im Gehirn. Starb in 14 Std.
723	„	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	Ruhiges Atmen. Lag auf der Seite und konnte nicht stehen. Erholte sich, überlebte.
656	Subcut. Gwb.	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,33 ccm „ 100 g „	O-Symptome.
657	„	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,33 ccm „ 100 g „	„
500	Intraperitoneal	428	0,06 ccm „ 100 g „	0,66 ccm „ 100 g „	Gleich ein wenig Unruhe; sonst nichts; Temperaturfall.
580	Intraperitoneal	487	0,05 ccm „ 100 g „	2,00 ccm „ 100 g „	Dgl.
585	Intraperitoneal	570	0,12 ccm „ 100 g „	2,00 ccm „ 100 g „	Dgl.
806	Intramuskulär in Oberschenkel	704	0,04 ccm „ 100 g „	1,8 ccm „ 100 g „	Ein Walnuß großes, derbes Infiltrat, das nur allmählich in einer Woche verschwand. Die Temperatur ging bis 87,2° nieder in 3 Std., stieg dann allmählich bis norm.

Digitized by Google

Überblickt man die obenstehende Tabelle, so sieht man sogleich, daß von den da vorkommenden Tieren nur ein einziges, ein in die Leber injiziertes Tier, an anaphylaktischem Schock gestorben ist (698). Da indessen die übrigen in die Leber injizierten Tiere (582, 699, 700) ganz ohne krankhafte Symptome ihre Injektionen vertrugen und 700 zudem $1^1/_2$ mal größere Dosis als 698 erhielt, so ist sicher der Tod von 698 ein Zufall, wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, daß die Injektionsspritze in eine große Lebervene hineingekommen war und so das Serum beinahe direkt in Vena cava hineinfloß. (Siehe auch unten die Injektionen in Vena porta S. 151) Vielleicht konnte man hier einwenden, daß auch die Tiere 582 und 581 an Anaphylaxie gestorben wären, hätten sie nicht während der Narkose die Injektionen bekommen. Die Narkose übt ja bekanntlich einen gewissen schützenden Einfluß auf die Entwicklung des Schocks bei der gewöhnlichen Anaphylaxie aus, und deswegen ist es wahrscheinlich, daß sie auch bei dieser Form der Anaphylaxie nicht ohne Bedeutung ist. Selbstverständlich habe ich Versuche hierüber angestellt, worauf ich später zurückkomme (S. 144), und aus diesen geht hervor, daß die Narkose allerdings die toxische Wirkung des Serums erheblich herabzusetzen vermag, aber nur wenn die Seruminjektion kurz nach der Narkose gegeben wird; kommt die Injektion, wie es hier der Fall war, erst 4 Stunden nach der Narkose, so spielt diese fast keine Rolle mehr. Demnach kann auch keine Rede davon sein, daß die Tiere 582, 581 der Narkose wegen dem Tode entgangen sind.

In bezug auf die ins Gehirn injizierten Tiere sehen wir, daß sie alle mit einer einzigen Ausnahme (723) erlegen sind, doch nicht an anaphylaktischem Schock, was ich ganz besonders auch hier hervorheben möchte. Daß die meisten hierhergehörigen Tiere starben, ist indessen leicht verständlich, wenn nur folgende Tatsachen berücksichtigt werden. Injektionen von Meerschweinchengehirn bei Kaninchen rufen ja[1]) Hammelhämolysine hervor und wie die übrigen Meerschweinchenorgane bindet auch das Gehirn sowohl Hammelhämolysine wie die meerschweinchentoxische Substanz hammelhämolytischer Sera. Wird nun ein solches Serum ins Gehirn eines Meerschweinchens injiziert, so werden deshalb die genannten Antikörper dort gebunden, wodurch die betreffende

[1]) Forssman, Diese Zeitschr. 37, 78.

Digitized by Google

Stelle des Gehirns wahrscheinlich verletzt wird. Ist dabei diese Stelle von vitaler Bedeutung, stirbt das Tier, im anderen Falle überlebt es wie 723.

Es ist also nicht gelungen, durch Injektionen in die Organe den anaphylaktischen tödlichen Schock zu erzeugen, und durch diese Versuchsreihe ist es auch höchstwahrscheinlich gemacht, daß es überhaupt nicht möglich ist, den tödlichen Schock in dieser Weise auszulösen. Hiergegen kann man allerdings einwenden, daß es vielleicht gelänge, wenn man größerere Serummengen als hier injizierte. Dabei möchte ich aber auf die Versuche 623 und 695 und ganz besonders auf die Peritonealinjektionen hinweisen. Von diesen habe ich nämlich nicht nur die in der Tabelle aufgenommenen, sondern für andere Zwecke noch 8 andere mit ungefähr derselben Dosis ausgeführt, wo also große Serummengen, bis 6 ccm, verwendet wurden, ohne in einem einzigen Falle einen ernsten Schock zu bekommen. Weshalb erhält man denn bei dieser Versuchsanordnung keinen Schock, trotzdem ungeheuer viel mehr Antigen und Antikörper miteinander reagieren als bei der eben tötenden intravenösen Injektion? Soweit ich sehen kann, hängt das davon ab, daß offenbar die Antikörper nur von den Gefäßen aus den Schock bewirken können. Bei den Injektionen in die Organe dringt wahrscheinlich ungeheuer wenig von den toxischen Antikörpern in die Zirkulation ein, und wenn sie auch in größerer Menge eindringen würden, so geschieht dies sicherlich so langsam, daß wohl darunter antianaphylaktische Zustände sich entwickeln müssen.

Aus einer Arbeit von Fex und mir ist es, wie schon obenerwähnt, bekannt, daß man Antianaphylaxie bei der umgekehrten Anaphylaxie durch intravenöse Seruminjektionen, welche hinab bis $^1/_{35}$ der minimalen, intravenös schnell tötenden Dosis gehen, erhält. Demnach ist man imstande, das Eindringen in die Blutbahn von solchen kleinen Mengen toxischer Antikörper durch Untersuchung auf eventuelle Antianaphylaxie zu prüfen und auf diesem Wege habe ich versucht, die in die Zirkulation eingedrungenen Antikörper nach Injektionen in die Organe aufzuspüren.

Von allen hier (Tab. II) injizierten Tieren überlebten nur zwei, das Tier 654, das eine intravenöse Erstinjektion erhielt um als antianaphylaktisches Kontrolltier zu dienen und das am 25. X.

Digitized by Google

Tabelle II.

Alle Injektionen mit Serum 591 gemacht. Vor den Reinjektionen wurden die Serumverdünnungen selbstverständlich genau austitriert, dabei erwies sich die intravenös, akut tödliche Dosis der Verdünnung vom 28. X. 0,12 ccm pro 100 g Tier, diejenige vom 10. XI. 0,10 ccm pro 100 g Tier; diese Dosen sind dann bei den Reinjektionen angewandt.

Tier Nr.	Gewicht g	Datum der Erstinjekt.	Injektionsstelle	Injektionsdosis	Datum der Reinjekt.	Resultat
656	350	28. X.	Subcutan	1 ccm	28. X.	† in 9 Min. Typ. Anaphylaxie.
659	365	23. X.	Intraperitoneal	1 ccm	28. X.	† in 17 Min. Typ. Anaphylaxie.
654	305	23. X.	Intravenös	0,06 ccm pro 100 g Tier	28. X	Überlebt. Gesund.
660	325	24. X.	Subcutan	1 ccm	28. X.	† in 8 Min. Typ. Anaphylaxie.
662	345	24. X.	Intraperitoneal	1 ccm	28. X.	† in 39 Min. Typ. Anaphylaxie.
664	355	25. X.	Subcutan	1 ccm	28. X.	† in 79 Min. Typ. Anaphylaxie.
668	340	25. X.	Intraperitoneal	1 ccm	28. X.	Überlebt. Schw. Anaphylaktische Respirationsstörung.
679	360	7. XI.	Subcutan	1 ccm	10. XI.	† in 28 Min. Typ. Anaphylaxie.
674	340	7. XI.	Intraperitoneal	1 ccm	10. XI.	† in 75 Min. Typ. Anaphylaxie.
681	295	8. XI.	Subcutan	1 ccm	10. XI.	† in 17 Min. Typ. Anaphylaxie.
682	275	8. XI.	Intraperitoneal	1 ccm	10. XI.	† in 30 Min. Typ. Anaphylaxie.

Aus Vorversuchen wußte ich, daß, wenn man Tiere intraperitoneal mit großen Dosen injiziert und den folgenden Tag Reinjektionen macht, die Tiere ungefähr ebenso schnell sterben wie die Kontrolltiere. Deswegen sind keine Tiere den 9. XI. injiziert.

intraperitoneal erstinjizierte Tier 668. Wenn man von den Tieren 656 und 660 absieht, welche ebenso schnell starben wie die Kontrolltiere, so wurde der Tod durch die gegebenen subcutanen bzw. intraperitonealen Injektionen mehr oder weniger verspätet; also eine mehr oder weniger ausgesprochene Antianaphylaxie hatte sich ausgebildet. Sie war am dritten Tag nach der Erstinjektion am besten entwickelt, aber doch nicht stärker als daß das überlebende Tier 668 schwere Respirationsstörungen aufwies und nicht wie 654 symptomfrei die Reinjektion vertrug.

Von den subcutan oder intraperitoneal injizierten Antikörpern dringen also, in Übereinstimmung mit dem,

Digitized by Google

was schon oben gesagt wurde, nur ein winziger Bruchteil in die Zirkulation ein. Bei dem Tier 668, wo die stärkste Antianaphylaxie vorkam und wo folglich auch die größte Menge Antikörper in die Zirkulation eingedrungen war, kann man, da das Tier doch schwere Symptome aufwies, den eben erwähnten Angaben von Fex und mir gemäß schätzungsweise sagen, daß die in die Zirkulation hineingekommenen Antikörper sicher nicht $^1/_{25}$ der intravenös, akut tödlichen Dosis überstieg. Diese Dosis ist für Tier 668 (340 g) 0,408 ccm und $^1/_{25}$ davon ist rund 0,01 ccm. Das ist aber genau $^1/_{100}$ der ganzen, intraperitoneal injizierten Serummenge. Wenn man demnach annimmt, daß etwa $^1/_{100}$ der intraperitoneal injizierten Antikörper in die Zirkulation übergeht, sollte man also 100 tödliche Dosen intraperitoneal injizieren, damit eine in die Zirkulation kommen würde, wie eine einfache Berechnung zeigt, würde dies für Tier 668 und das hier benutzte Serum 36 ccm ausmachen. Eine solche Dosis verträgt aber nicht ein Tier intraperitoneal derjenigen Veränderungen wegen, welche als Folgen einer solchen Injektion entstehen. Das habe ich bei Tier 805 gesehen, welchem ich 10 ccm Serum 704 intraperitoneal gab (was ungefähr 83 tödliche Dosen für ein solches Tier ausmacht). Das Tier starb in ungefähr 12 Stunden ohne Spur von Schock zu zeigen, ruhig atmend und ohne Krämpfe, aber mit schnell (in $6^1/_2$ Stunden) bis 31,5° heruntergehender Temperatur und bei der Sektion wurde eine serofibrinöse Peritonitis gefunden, ganz so wie man sie nach einer intraperitonealen Injektion von $^1/_2$ ccm einer 1 proz. Silbernitratlösung sieht, wonach auch die Temperatur genau so wie oben sich verhält.

Nach alledem ist es also sicher, daß es nicht nur nicht gelingt, den Schock leichter oder mit kleineren Serumdosen von einem der geprüften Organe heraus als intravenös auszulösen, sondern daß man im Gegenteil auf jenem Wege überhaupt nicht einen tödlichen Schock zu bewirken vermag und daß ein solcher Schock augenscheinlich nur durch intravasale Injektionen hervorgerufen werden kann. Daß dabei der Schock durch eine Einwirkung der Antikörper auf die die Gefäßwände ausmachenden Zellen erzeugt wird, scheint mir das wahrscheinlichste.

Digitized by Google

II. Die Bedeutung der Narkose für die Entwickelung des Schocks bei der umgekehrten Anaphylaxie.

Wie schon obenerwähnt wurde, habe ich aber noch zwei andere Wege benutzt, um die Bedeutung der verschiedenen Organe bei der Schockerzeugung zu eruieren, nämlich teils Organexstirpationen, teils Injektionen direkt in die zuführenden Gefäße der Organe. Da zwar ja nicht jedes Organ exstirpiert werden kann, und aus technischen Gründen (wegen der Kleinheit der Gefäße) es auch nicht gelingt, bei jedem Organe in die zuführenden Gefäße zu injizieren, so ergänzen diese Untersuchungsmethoden einander gegenseitig.

Bei den Organexstirpationen kommt indessen noch ein Faktor hinzu, nämlich die Narkose. Es ist ja nicht möglich, ohne tiefe Narkose der Tiere die Organe zu entfernen und um die Bedeutung der Organexstirpationen für den Schock beurteilen zu können, muß man deswegen zuerst prüfen, ob vielleicht eine einfache Narkose ohne jegliche Organexstirpation auch das Hervortreten des Shocks beeinflußt.

Bei der gewöhnlichen Anaphylaxie hat Besredka[1]) als der erste gefunden, daß die Narkose, besonders die Äthernarkose, den Schock verhindern kann. Allerdings hat die Narkose nicht unter allen Verhältnissen diesen Einfluß. Thomson[2]) hat nämlich gezeigt, daß bei hochsensibilisierten Tieren die Narkose den Shock nicht oder, wenn überhaupt, sehr wenig zu beeinflussen vermag, während ihr bei schwachsensibilisierten Tieren wirklich die von Besredka behauptete Bedeutung zukommt. Diese Angaben von Thomsen kann ich auch aus eigener Erfahrung vollkommen bestätigen.

Bei der umgekehrten Anaphylaxie, wo das Antigen in großen Mengen in den Organen vorkommt, ganz so wie die Antikörper bei den hochsensibilisierten Tieren, ist ein großer Einfluß von der Narkose auf die Entwicklung des Schocks kaum zu erwarten.

In der folgenden Tabelle habe ich nun eine Zusammenstellung einiger hierhergehöriger Versuche gegeben.

Hier und überall, wo Narkose angewandt worden ist, sind die Tiere durch Inhalation von Äther narkotisiert. Während der in der Tabelle angegebenen Narkosezeit ist die Narkose sehr tief gewesen.

[1]) Bull. de l'Inst. Past. 1908, S. 899.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **26.**

Digitized by Google

Tabelle III.

Tag des Versuches	Tier Nr.	Gewicht g	Narkose-zeit	Serum Nr.	Injizierte Serumdosis	Zeit zwischen Narkose und Seruminjektion	Resultat
1. XII. 19.	710	390	5 Min.	704	0,04 ccm pro 100 g Tier	Injektion während der Narkose	† in 30 Min. Typ. Anaphylaxie.
1. XII. 19.	712	345	Keine Narkose	704	0,04 ccm „ 100 g „	—	† „ 20 „ „ „
26. IV. 20.	945	315	5 Min.	704	0,05 ccm „ 100 g „	17 Min. nach der Narkose	† „ 14 „ „ „
26. IV. 20.	939	340	Keine Narkose	704	0,05 ccm „ 100 g „	—	† „ 4 „ „ „
7. II. 20.	800	340	10 Min.	704	0,045 ccm „ 100 g „	1 Std. 45 Min. nach d. Narkose	† „ 32 „ „ „
7. II. 20.	804	310	Keine Narkose	704	0,045 ccm „ 100 g „	—	† „ 6 „ „ „
18. VI. 19.	598	235	15 Min.	540	0,12 ccm „ 100 g „	3 Std. nach der Narkose	† „ 10 „ „ „
18. VI. 19.	599	285	15 „	540	0,10 ccm „ 100 g „	3 „ „ „ „	Überlebt. Unbedeut. Anaphylaktische Symptome.
18. VI. 19.	601	320	Keine Narkose	540	0,12 ccm „ 100 g „	—	† in 8 Min. Typ. Anaphylaxie.
18. VI. 19.	602	320	„ „	540	0,10 ccm „ 100 g „	—	† „ 50 „ „ „
26. IV. 20.	943	415	15 Min.	704	0,05 ccm „ 100 g „	14 Min. nach der Narkose	Überlebt. Schwache Respirationsstörungen.
26. IV. 20.	944	360	15 „	704	0,05 ccm „ 100 g „	15 „ „ „ „	† in 18 Std. Stärkere anaphylakt. Respirationsstörungen.
26. IV. 20.	942	330	15 „	704	0,05 ccm „ 100 g „	1 Std. nach der Narkose	† in 6 Min. Typ. Anaphylaxie.
26. IV. 20.	941	330	15 „	704	0,05 ccm „ 100 g „	1 Std. 15 Min. nach d. Narkose	† „ 5 „ „ „
26. IV. 20.	940	345	15 „	704	0,05 ccm „ 100 g „	2 „ 13 „ „ „ „	† „ 4 „ „ „

Digitized by Google

Da es bei den Organexstirpationen nicht nötig gewesen ist, die Narkose länger als 15 Minuten zu unterhalten, habe ich in dieser Versuchsreihe, wo es nur darauf ankam, die Bedeutung der Narkose bei der genannten Organexstirpationen festzustellen, auch nicht längere Narkosen als 15 Min. geprüft. Von den hier benutzten Sera haben wir früher nicht Serum 540 gehabt. Das ist ein mit Hammelblut beim Kaninchen erzeugtes hämolytisches Serum mit einem Titer von 20 000 gegenüber Hammelblut.

Vergleicht man nun die Tiere 940—944, welche alle 15 Minuten lang narkotisiert worden sind, aber in verschiedenen Zeitabständen nach den Narkosen injiziert worden sind, so findet man, daß die Narkose schützt (943) bzw. den Tod erheblich verspätet (944), wenn die Seruminjektion kurz nach der Narkose (14—15 Minuten) gegeben wird, während die später (1 Stunde und später) injizierten Tiere alle ebenso schnell anaphylaktisch sterben wie das Kontrolltier (939) so ist auch der Fall mit dem Tier 598, das 3 Stunden nach der Narkose die Seruminjektion bekam. Indessen sieht man doch, daß bei Verwendung von schwächeren Serumgaben (599) die Narkose eine schützende Wirkung auch während einiger Stunden ausüben kann (Kontrolltier 602), sowie daß in Ausnahmefällen (800) die Narkose selbst nach 1 Stunde 45 Minuten bei intravenös, sonst schnell tötender Dosis (Kontrolltier 602) den Tod ein wenig verspätet. Bei verschiedenen Narkosezeiten und gleichlangen Intervallen zwischen der Narkose und den Seruminjektionen schützt, wie zu erwarten ist, die längere Narkose besser als die kürzere (siehe 945 im Vergleich mit 943, 944).

Hiernach ist es deutlich, daß, wenn man mehrere Stunden nach der Narkose die Seruminjektion macht, wie ich es immer nach den Organexstirpationen getan habe, die vorhergehende Narkose für den Ausgang keine (nennenswerte) Bedeutung hat.

III. Die Rolle der Bauchorgane beim Erzeugen des Schocks nach der einfachen, intravenös, akut tödlichen Serumdosis bei der umgekehrten Anaphylaxie.

A. Die Nieren.

Nachdem also der Einfluß der Narkose auf den Schock festgestellt war, habe ich nun bei einer Reihe von Tieren Organexstirpationen gemacht, und gebe ich nun erst eine tabellarische Übersicht über die Nierenexstirpationen (Tabelle IV), wozu noch einige Versuche mit doppelseitiger Ureterunterbindung gefügt sind.

Digitized by Google

Tabelle IV.

Tier Nr.	Gewicht g	Exstirpiertes Organ	Injizierte Serumdosis	Serum Nr.	Zeit zwischen Organexstirpation u. Seruminjektion	Resultat
565	350	—	0,09 ccm pro 100 g Tier	540	—	† in 3 Min. Typ. Anaphylaxie.
564	380	Beide Nieren	0,09 ccm „ 100 g „	540	Ungefähr 3 Std.	Zittert ein wenig. Keine anaphylaktischen Symptome.
601	320	—	0,12 ccm „ 100 g „	540	—	† in 8 Min. Typ. Anaphylaxie.
603	295	Beide Nieren	0,12 ccm „ 100 g „	540	4 Std. 30 Min.	Gar keine anaphylakt. Symptome.
604	255	„ „	0,24 ccm „ 100 g „	540	4 „ 30 „	† in 15 Min. Typ. Anaphylaxie.
605	250	„ „	0,24 ccm „ 100 g „	540	4 „ 30 „	† „ 15 „ „ „
606	260	Beide Nieren und die rechte Nebenniere.	0,24 ccm „ 100 g „	540	4 „ 30 „	† „ 10 „ „ „
721	400	Die rechte Niere	0,05 ccm „ 100 g „	704	3 Std.	† „ 6 „ „ „
722	295	—	0,05 ccm „ 100 g „	704	—	† „ 10 „ „ „
797	290	Beide Nieren	0,045 ccm „ 100 g „	704	45 Min.	† „ 1 Std. 25 Min. Typ. „
798	380	„ „	0,045 ccm „ 100 g „	704	2 Std. 45 Min.	Überlebt. Schnell vorübergehende Respirationsbeschleunigung.
799	460	Beide Ureteren unterbunden	0,045 ccm „ 100 g „	704	2 Std.	† in 3 Std. 20 Min. Typ. Anaphylaxie.
796	340	—	0,045 ccm „ 100 g „	704	—	† in 6 Min. Typ. Anaphylaxie.
962	355	Beide Ureteren unterbunden	0,08 ccm „ 100 g „	927	4 Std.	† „ 8 „ „ „
972	445	Beide Nieren	0,08 ccm „ 100 g „	927	$2^1/_2$ Std.	† „ 8 „ „ „
975	410	„ „	0,08 ccm „ 100 g „	927	$1^1/_2$ „	† „ 20 „ „ „
973	360	„ „	0,08 ccm „ 100 g „	927	$3^1/_2$ „	Überlebt. Ruhiges Atmen. Keine anaphylaktischen Symptome.
977	400	—	0,08 ccm „ 100 g „	927	—	† in 10 Min. Typ. Anaphylaxie.

Digitized by Google

Nur diejenigen Tiere, bei denen die eine oder beide Nieren entfernt sind, nicht aber diejenigen, bei denen ich Ureterunterbindungen vorgenommen habe, sind narkotisiert worden. Von den hier benutzten Sera ist uns nur Serum 927 neu. Das ist ein gewöhnliches, durch Hammelblutinjektionen bei Kaninchen erhaltenes Serum vom Titer 20 000.

Die Kontrolltiere 565, 601, 722, 796 und 977 sind aus größeren Reihen herausgenommen, wo die minimalen, akut tödlichen Dosen bestimmt worden sind, und wo eben diese Tiere die gesuchte Dosis repräsentierten. Das für ein und dasselbe Serum, besonders für das Serum 540, verschiedene Dosen als die minimale, akut tödliche angegeben sind, hängt hauptsächlich davon ab, daß die obenstehenden Versuche zu weit verschiedenen Zeiten vorgenommen sind, und daß das Serum in der Zwischenzeit sich verändert hat, teils natürlicherweise auch davon, daß wegen Meßfehlern es ja nie gelingt, zwei Serumverdünnungen von genau derselben Konzentration zu bereiten. Demselben werden wir auch in anderen Tabellen begegnen.

Wie aus 564, 603, 798 und 973 hervorgeht, werden diejenigen Tiere, bei denen beide Nieren entfernt worden sind, vollständig oder beinahe vollständig gegen die akut tödliche Dosis unempfindlich — also ganz derselbe Effekt wie bei antianaphylaktisierten Tieren; aber, wie da, vertragen sie nie die doppelte tödliche Dosis (604, 605) und dies auch nicht, wenn man nebst den Nieren auch die eine Nebenniere wegnimmt (606).

Exstirpiert man nur die eine Niere, so folgt daraus keine Veränderung der Empfindlichkeit (721).

Da ich zum erstenmal das Wegfallen der Empfindlichkeit nach beiderseitiger Nierenexstirpation sah und dabei berücksichtigte, daß die Nieren sehr große Mengen von Antigen enthalten, glaubte ich hiermit diejenigen Organe gefunden zu haben, in denen das am meisten avide Antigen konzentriert war und durch deren Wegnahme man also die Tiere für die genannte Dosis resistent machen könnte.

Bei genauerem Nachsinnen fand ich es doch möglich, daß der betreffende Effekt der Nierenexstirpationen auch in anderer Weise als der obenerwähnten zustande kommen könnte. Durch das Entfernen der Nieren wird ja auch ein Wegfallen ihrer Sekretion bewirkt, und hierdurch wird vielleicht die Reaktion zwischen Antigen und Antikörper verhindert oder erschwert.

Verhält es sich in dieser Weise, so muß die Resistenz der nephrektomierten Tiere gegen das Serum mit der Entfernung vom Operationsaugenblick zunehmen, denn je länger der Organismus

Digitized by Google

ohne Nieren gelebt hat, je mehr Retentionsprodukte müssen im Körper angesammelt sein.

Wir sehen nun auch aus der Tabelle, daß es tatsächlich so ist. Vergleiche nur 797 mit 798 und 973 mit 972 und 975, so findet man, daß 45 Minuten (797), $1^1/_2$ Stunde (975) und selbst $2^1/_2$ Stunden nach der Operation keine erhöhte Resistenz zu bemerken ist, dagegen nach 2 Stunden 45 Minuten und später. Um vollständige Resistenz gegen die einfache tödliche Dosis zu bekommen, muß man demnach wenigstens 2 Stunden 45 Minuten (798) oder 3 Stunden (564), noch sicherer aber $3^1/_2$ Stunden (973) oder mehr nach der Operation abwarten. (Individuelle Variationen kommen doch sicherlich hier vor und können die Grenze verschieben.)

Hiernach war es naheliegend zu versuchen, ob man nicht auch durch Ureterenunterbindungen dieselbe Resistenz erhalten würde. In den wenigen Versuchen (799, 962), die ich darüber angestellt habe, sind die Resultate wechselnd gewesen, vielleicht beruhend auf Verschiedenheiten der Tiere und vor allem darauf, daß ich, trotzdem ich bis 4 Stunden nach der Unterbindung (962) mit der Injektion wartete, noch länger hätte warten sollen.

Aus den Nierenversuchen ist es indessen deutlich, daß eine vollkommene Resistenz gegen die einfache, intravenös akut tödliche Dosis sich nach doppelseitiger Nierenexstirpation entwickelt, daß diese Resistenz nicht davon abhängt, daß mit den Nieren das am meisten avide Antigen, welches mit der einfach tödlichen Serumdosis den Schock auslöst, aus dem Körper entfernt wird, sondern durch die vollständige Retention der von den Nieren sonst eliminierten Sekretionsprodukte bedingt wird.

B. Die Milz und die Därme.

In tiefer Narkose wurde die Milz bei einigen Meerschweinchen exstirpiert. 4—5 Stunden später wurden die Tiere mit hammelhämolytischer Sera intravenös injiziert. Dabei erwies es sich, daß der Schock nach genau derselben minimalen Dosis hervortrat wie bei normalen Tieren. Die Milz hat demnach keine Bedeutung für die Entwicklung des Schockes nach Injektion der einfachen, intravenös akut tödlichen Serumdosis.

Digitized by Google

Auch die Rolle der Därme in dieser Beziehung versuchte ich in derselben Weise, d. h. durch Exstirpation ausfindig zu machen. Indessen werden die Tiere, welche eine solche Operation durchgemacht haben, so sehr entkräftet, daß es, obwohl sie jedenfalls 6—8 Stunden nach der Operation leben, schwierig ist, sie als Versuchstiere zu verwenden. Bei den Versuchen, die ich doch vorgenommen habe, habe ich den Eindruck bekommen, daß die Därme wie die Milz ohne Bedeutung für den Schock nach der einfachen, intravenös akut tödlichen Serumdosis sind.

C. Die Leber.

Die Rolle der Leber beim Schock der gewöhnlichen Anaphylaxie scheint bei verschiedenen Tieren verschieden zu sein. Denecke[1]) hat z. B. bewiesen, daß bei Hunden mit Eckfistel keine Sensibilisierung nach 1 ccm Ovalbumin zustande kommt und R. Weil[2]) meint auf Grund seiner Versuche mit ausgeschnittenen Lebern von sensibilisierten Hunden, daß der Schock beim Hunde aus einer cellularen Reaktion des Leberparenchyms herrührt. Im Gegensatz hierzu findet Weil, daß beim Meerschweinchen die Leber keine solche hervorragende Bedeutung für die Entwicklung des Schocks hat, sondern daß hier anstatt der Leber die glatte Muskulatur der Hauptentwicklungsplatz des Schockes ist.

Uffenheimer und Awerbruch[3]) haben sogar behauptet, daß die Leber eine schützende Wirkung bei der Anaphylaxie des Meerschweinchens habe. Als Grundlage für diese Auffassung gelten große Versuchsreihen, in denen die Verfasser Sensibilisierungen und Reinjektionen in Mesenterialvenen bei Meerschweinchen gemacht haben, und die hierdurch erzielten Resultate mit den Resultaten von subcutanen, intrajugularen und intraperitonealen Sensibilisierungen bzw. von intrajugularen Reinjektionen verglichen haben. Durchsieht man aber die Versuchsprotokolle dieser Autoren, so findet man ihre Schlußfolgerungen jedenfalls betreffs der Reinjektionen nicht stichhaltig. Die Verschiedenheit zwischen den intrajugularen und den in Mesenterialvenen gemachten Reinjektionen ist in meinen Augen

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **20**.
[2]) Journ. of immunology **2**. Cit. cf. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk.
[3]) Arch. f. Hyg. **83**.

Digitized by Google

entschieden zu unbedeutend, um diese Konklusion zu berechtigen und auch in bezug auf die Sensibilisierungen scheint sie mir höchst unsicher. Es ist allerdings unzweifelhaft, daß zwischen der Sensibilität nach subcutanen und in Mesenterialvenen gemachten Injektionen ein großer Unterschied hervortritt, aber wenn man die Sensibilität nach den in Mesenterialvenen gemachten Injektionen mit den nach intraperitonealen und vor allem intrajugularen Injektionen vergleicht, so findet man keine große Verschiedenheit — so weit ich sehe — nicht größer, als daß sie von Zufälligkeiten abhängen kann. Hiermit möchte ich selbstverständlich nicht bestreiten, daß die Leber möglicherweise eine gewisse Schutzwirkung ausübe, da ich darüber keine eigenen Versuche gemacht habe, nur finde ich es nicht durch die erwähnten Experimente von Uffenheimer und Awerbruch bewiesen. Wäre es doch der Fall, würde es gut mit meiner Erfahrung bei der umgekehrten Anaphylaxie stimmen.

Die Bedeutung, welche der Leber bei dieser Form der Anaphylaxie zukommt, ist bisher nicht untersucht. Das einzige was man weis, ist, daß die Leber ebenso wie übrige Organe Antigen enthält und deswegen bei der Entwicklung des Schocks teilnehmen kann.

Die Versuche, welche ich nun vorgenommen habe, um diese Frage aufzuklären, bestehen in Injektionen von hammelhämolytischen Sera in eine Darmvene kurz vor dem Einfluß in Vena porta, wodurch ja die Leber von der injizierten Flüssigkeit aus erster Hand durchgespült wird. Nach einiger Übung war es sehr leicht, diese Injektionen auszuführen und Narkose war dabei gar nicht nötig. Nach der Injektion mußte selbstverständlich die Vene unterbunden werden. Folgende Tiere wurden nun in dieser Weise injiziert. (Tab. V.)

Aus der umstehenden Tabelle geht hervor, daß kein einziges von den mit den Seren 591 und 704 in die Mesenterialvenen injizierten Tieren an anaphylaktischem Schock gestorben ist, noch zeigten sie Krämpfe oder denjenigen Typus von Respirationsstörungen, welche wir gewöhnt sind beim Schock zu sehen; und doch bekamen diese Tiere wenigstens die einfache, intravenös akut tödliche Serumdosis (694, 777) und das Tier 778 sogar die doppelte Menge, eine Dosis, die intrajugular injiziert, wie schon gesagt, kein Tier auch nach Antianaphylaktisierung verträgt. Die Tiere 960, 961, welche das Serum 927 bekamen, starben dagegen und da sie beide sowohl den anaphylaktischen Respirationstypus wie Lungen-

Digitized by Google

Tabelle V.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Minimale, intravenös akut tödliche Dosis	Injizierte Dosis	Resultat
694	315	591	0,08 ccm pro 100 g Tier	0,08 ccm pro 100 g Tier	Keine anaphylaktischen Symptome. Ruhiges Atmen. Lebt noch nach 24 Stunden.
701	360	591	0,08 ccm „ 100 g „	0,12 ccm „ 100 g „	dgl.
720	315	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „	dgl.
777	450	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	dgl.
778	420	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,08 ccm „ 100 g „	dgl.
960	330	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,16 ccm „ 100 g „	Schnelles Atmen. Dyspnöe. Stirbt in 80 Minuten mit Lungenödem - Emphysem. Keine Krämpfe.
961	355	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,32 ccm „ 100 g „	Schnelles Atmen. Dyspnöe. Stirbt in 2 Stunden mit Lungenödem-Emphysem. Keine Krämpfe.

ödem und Emphysem aufwiesen, ist es wahrscheinlich, daß sie an anaphylaktischem Schock starben, obwohl sie keine Krämpfe hatten. Von diesen Tieren bekam das eine die doppelte und das andere viermal die intravenös akut tödliche Dosis, und selbst wenn ihr Tod anaphylaktisch war, war er erheblich verspätet.

Hieraus sieht man also deutlich, 1. daß die Leber nicht dasjenige Antigen enthält, das den Schock bei einer einfachen, intravenös akut tödlichen Dosis auslöst, sondern 2., daß die Leber vielmehr die Eigenschaft besitzt, die toxischen Effekte des Serums mehr oder weniger wegzunehmen und so den Schock zu verhindern.

D. Die Nebennieren.

Diese Organe habe ich weder beiderseitig entfernen noch in deren zuführenden Gefäßen injizieren können. Um doch so weit als möglich ihre Bedeutung für den Schock kennen zu lernen, habe ich den Einfluß ihres wichtigsten Produktes, des Adrenalins, auf den Schock geprüft.

Daß das Adrenalin nicht ohne Einfluß auf die Wirkung von toxischen Substanzen ist, geht aus früheren Untersuchungen hervor. Den Angaben von Marie gemäß[1]) übt so das Adrenalin auf Abrin, Crotin, Ricin, Diphtherie- und Tetanustoxin eine

[1]) Annal. de l'Inst. Pasteur 27 und 32.

Digitized by Google

neutralisierende Wirkung aus. Beim Tetanus genügt z. B. $^1/_{100}$ mg von Adrenalin um 100 tödliche Dosen für weiße Mäuse zu entgiften. Gegenüber Alkaloiden und Tuberkulin ist es dagegen wirkungslos. Marie weist daraufhin, daß die erste Gruppe Antigene sind, die anderen aber nicht. Auch bei der gewöhnlichen Anaphylaxie hat sich das Adrenalin als wirksam erwiesen. Galambos[1]) hat nämlich gefunden, daß $^1/_{60}$ mg ($^1/_{30}$ mg wirkt schon selbst letal) das sensibilisierte Tier (Meerschweinchen) gegen das 3 bis 4fache der sonst tödlichen Serumdosis schützte, wenn es 26 Minuten (das optimale Intervall) vor der Seruminjektion, und nur gegen das $2^1/_2$fache dieser Dosis, wenn die beiden Flüssigkeiten gleichzeitig injiziert wurden. Eine Menge von $^1/_{120}$ mg schützte dagegen nicht gegen die letztgenannte Serumdosis, selbst wenn das Adrenalin 26 Minuten vor der Serumdosis gegeben wurde.

Offenbar kann man bei ähnlichen Untersuchungen die Versuchsbedingungen ins Unendliche variieren. Bei meinen Versuchen über die hier uns interessierende Frage bei der umgekehrten Anaphylaxie bin ich folgenderweise vorgegangen. Ich habe die Adrenalinlösung und das Serum teils vermischt teils nacheinander benutzt, und im letzten Falle mit so kleinem Intervall wie es möglich war, um nur die Spritzen in der im Gefäße liegenden Kanüle zu wechseln. Beim Vermischen der Flüssigkeiten habe ich auch so schnell wie möglich nach dem Vermischen die Injektionen gemacht. Da es doch bisweilen — besonders da eine ganze Reihe mit derselben Mischung injiziert werden sollte — eine nicht allzu geringe Zeit zwischen Vermischen und Injektion verging — bei dem letzten Tier einer Serie konnte es bis $1^1/_2$ Stunde dauern —, habe ich geprüft, ob während einer solchen Zeit einige Veränderungen in der Wirkung eintreten. Das habe ich aber nicht finden können. Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß ich nur nach Veränderungen der Serumwirkung, nicht nach Veränderungen der Adrenalinwirkung suchte, also keine Prüfungen betreffs Blutdruckschwankungen usw. anstellte. Da ich zudem aus Gründen, welche unten näher besprochen werden, so kleine Adrenalinmengen in meinen Mischungen verwandte, daß dadurch keine Adrenalinvergiftungssymptome auftraten, habe ich nicht merken können, wenn die Adrenalinwirkung wegfiel. Dies ist für diese Untersuchung übrigens belanglos.

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. 19.

Digitized by Google

Ich hebe dies hervor, da es sonst merkwürdig auffallen könnte, daß Änderungen in einer Mischung von Adrenalin und Serum nicht hervortreten würden, da ja das Adrenalin in solchen Mischungen sehr labil ist.

Die Mischungen ebenso wie die Sera und Adrenalinlösungen wurden immer vor Licht geschützt bei ungefähr 20° während der Versuchszeit aufbewahrt. Zu diesen Versuchen habe ich das Serum 757 angewandt. Es ist ein hammelhämolytisches, durch Injektion von Hammelblut erhaltenes Kaninchenserum mit hämolytischem Titer von 20 000.

Bei allen in dieser Arbeit vorgenommenen Adrenalinversuchen wurde Mercks Adrenalinlösung verwandt. Hier und in folgenden Tabellen, wo Adrenalin vorkommt, beziehen sich die Mengenangaben auf diese Lösung, nicht auf die ungelöste Substanz. 0,001 ccm Adrenalin bedeutet also 0,001 ccm dieser Lösung usw.

In der Tabelle VI gebe ich nur diejenigen Adrenalinversuche, welche intravenös gemacht worden sind; über in anderer Weise gemachte Adrenalininjektionen wird später[1]) berichtet.

Um nicht durch Intoxikationserscheinungen vom Adrenalin das Krankheitsbild, daß das Serum möglicherweise hervorrufen könnte, verwischt und verworren zu bekommen, habe ich mich in meiner Adrenalindosierung im allgemeinen unterhalb der toxischen Grenze gehalten.

Da einige Vorversuche und alle später erwähnten Adrenalininjektionen mir gelehrt hatten, daß das Adrenalin gar keine abschwächende Wirkung auf das Serum ausübte, sind die folgenden Versuche nur in der Absicht vorgenommen, um etwaige Verstärkung des Serums zu entschleiern.

Die ersten 4 Injektionen der Tabelle sind vorgenommen um die Toxizität der Adrenalinlösung herauszufinden. Wie ersichtlich sieht man noch bei 0,025 ccm, d. h. ungefähr 0,005 pro 100 g Tier (715) ernste Intoxikationserscheinungen, bei 0.003 pro 100 g Tier (715b) dagegen nichts davon.

Schon oben wurde gesagt, daß das Adrenalin keinen abschwächenden Einfluß auf das Serum hatte. Das wird auch hier bestätigt. Es geht nämlich aus einem Vergleich zwischen den Tieren 956 und 949 hervor, daß die Serumwirkung durch Adrenalin nicht abgeschwächt, aber auch nicht verstärkt wird. Die beiden Tiere wiesen gleichstarke, anaphylaktische Phänomene auf, trotzdem daß 956 nebst dem Serum eine nicht geringe Adrenalindosis

[1]) Diese Zeitschrift **110** S. 172.

Digitized by Google

Tabelle VI.

+ zwischen den injizierten Serum- und Adrenalindosen bedeutet, daß das Serum und das Adrenalin in Mischung injiziert wurden; V und N auf demselben Platz bedeutet, daß Serum und Adrenalin jedes für sich injiziert wurde, und V daß dabei das Serum vor dem Adrenalin, N nach dem Adrenalin gegeben wurde.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Minimale intravenös, akut tödliche Serumdosis	Injizierte Serumdosis	Injizierte Adrenalindosis	Resultat
713	450	—	—	—	0.2 ccm	+
714	450	—	—	—	0,1 ccm	+
715	450	—	—	—	0,025 ccm	Überlebt. Lebhafte Muskelbewegung., Krämpfe. Tiefe, erschwerte Respiration.
715b	345	—	—	—	0,003 ccm pro 100 g Tier	Überlebt. Gar keine Symptone.
912	345	757	0,085 ccm pro 100 g Tier	0,015 ccm pro 100 g Tier +	0,001 ccm „ 100 g „	dgl.
913	310	757	0,085 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ V	0,001 ccm „ 100 g „	dgl.
914	380	757	0,035 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ N	0,001 ccm „ 100 g „	dgl.
954	340	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „ +	0,008 ccm „ 100 g „	Überlebt. Schnelles Atmen; bald normal.
956	310	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „ +	0,0085 ccm „ 100 g „	Überlebt. Schnelles Atmen vom anaphyl. Typ., dauert ungefähr 2 Std.; dann normal.
955	305	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	—	Überlebt. Gar keine Symptome.
949	345	927	0,08 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „	—	Überlebt; Respirationsstörungen v. anaphyl. Typ.

bekommen hatte. Auch bei dem Tiere 954 ist keine Verstärkung des Serums durch das Adrenalin zu spüren (vgl. mit Tier 955). Da das Adrenalin aber bekanntlich seine spezifische blutdruckregulierende Tätigkeit schon bei sehr geringen Dosen entfaltet und da ich nach Injektionen in die Carotis von 0,001 mg Adrenalin pro 100 g Tier zusammen mit Serum [1]) eine kräftige Veränderung der Serumwirkung gesehen hatte, habe ich auch diese kleine Adrenalindosis zusammen mit einer Serummenge, die ein wenig kleiner als die Hälfte der intravenös akut tödlichen Dosis, bei einigen Tieren (912, 913, 914) injiziert. Ich habe, wie die Tabelle zeigt, gar keine Verstärkung der Serumwirkung gesehen, wenn die Flüssigkeiten in Mischung oder jede für sich gegeben wurden.

[1]) Siehe meine Arbeit: Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektionen. Diese Zeitschrift **110** S. 173.

Digitized by Google

Aus alledem geht hervor, daß das Adrenalin bei intravenöser Injektion die Serumwirkung weder abschwächt noch verstärkt und deswegen wahrscheinlich keinen Einfluß auf die Entwicklung des Schocks bei der umgekehrten Anaphylaxie ausübt.

E. Injektionen tief in die Aorta.

Um nun eine experimentelle Zusammenfassung, wenn ich es so nennen darf, betreffs der Rolle der Bauchorgane für den Schock bei der einfachen, akut tödlichen Dosis zu bekommen, habe ich endlich versucht, die Seruminjektionen tief in die Aorta zu machen. Bei dieser Injektionsweise werden ja alle diejenigen Organe, welche unterhalb der eingeführten Kanülspitze liegen, direkt vom Serum durchgespült; und erst nach Passage durch diese Organe kann das Serum mit den obenliegenden Organen in Berührung kommen. Tragen viele von den Bauchorganen dazu bei, den genannten Schock auszulösen, so konnte man auch durch diese Aortainjektion eine Aufklärung erwarten.

Die Injektionen sind folgendermaßen gemacht.

Die rechte Carot. commun. wurde auf einer Strecke von 2 bis 3 cm und dabei so weit unten wie möglich freigelegt. Zwei Ligaturfäden wurden angelegt. Mit dem einen wurde das Gefäß oben definitiv unterbunden; der andere wurde nach unten geschoben und dann nur ganz leicht provisorisch zugezogen, um das Blut abzusperren, später aber gelockert werden zu können. Zwischen diesen beiden Ligaturen machte ich nun mit einem scharfen Messer einen longitudinalen Schnitt im Gefäße, führte hierdurch die stumpfe, feine Kanüle, welche im voraus schwach S-förmig gebogen war und fest an der die bestimmte Serummenge enthaltenden Spitze saß, in das Gefäß hinein, schob die Kanüle durch die untere, ein wenig gelockerte Ligatur allmählich tiefer und tiefer bis sie, den Arcus aorta folgend, tief in die Aorta eingedrungen war. Dabei soll die Ligatur nicht fester zugezogen werden als daß die Kanüle hineingeschoben werden kann, aber doch so fest, daß keine Blutung vorkommt.

Bei toten Tieren habe ich festgestellt, daß mit der von mir bei diesen Versuchen angewandten Kanüle die Kanülspitze zwischen der 3. und 4. Rippe lag. Nach gemachter Injektion wurde die Kanüle langsam zurückgezogen und dabei wurde darauf genau gepaßt, daß die Ligatur in demselben Augenblick, da die Kanüle aus der Ligaturstelle herausschlüpfte, fest zugemacht wurde, so daß nichts aus dem Gefäße herauskommen konnte. Im Anfang verlor ich mehrere Tiere durch Blutung beim Versuche, die Kanüle hineinzuschieben, aber später ist alles gut gegangen. Die Tiere zeigen merkwürdigerweise keine Unruhe beim Hineinschieben, vorausgesetzt, daß die Kanüle sehr dünn ist.

Digitized by Google

Tabelle VII.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Minimale intravenös akut tödliche Dosis	Injektionsstelle	Injizierte Serumdosis	Resultat
856	300	757 inaktiv	0,05 ccm pro 100 g Tier	Carotis gehirnwärts	0,017 ccm pro 100 g Tier	Überlebt. Vielleicht vertieftes Atmen.
858	350	757	0,05 ccm „ 100 g „	Aorta	0,017 ccm „ 100 g „	Überlebt. Keine Symptome.
859	320	757	0,05 ccm „ 100 g „	Carotis zentralwärts	0,017 ccm „ 100 g „	† in 10 Min. Manège. Strabism. Rechtes Auge Exophthalmus.
865	360	757	0,05 ccm „ 100 g „	Aorta	0,05 ccm „ 100 g „	Überlebt. Keine Symptome.
867	360	757	0,05 ccm „ 100 g „	„	0,05 ccm „ 100 g „	Überlebt. Unbedeutende Respirationsstörungen. Temp. 1 Std. nach Inj. 34,4°.
869	375	757	0,05 ccm „ 100 g „	„	0,05 ccm „ 100 g „	Überlebt. Unbedeutende Respirationsstörungen. Temp. 1 Std. nach Inj. 35,5°
881	330	704 inaktiv	0,055 ccm „ 100 g „	„	0,055 ccm „ 100 g „	dgl.
882	340	704	0,055 ccm „ 100 g „	„	0,055 ccm „ 100 g „	dgl.
883	320	704	0,055 ccm „ 100 g „	Carotis zentralwärts	0,018 ccm „ 100 g „	† in 8 Min. Fast momentan gelähmt. Strabism.
884	255	704	0,055 ccm „ 100 g „	Carotis gehirnwärts	0,018 ccm „ 100 g „	Überlebt. Keine Symptome.

In den beiden Versuchsserien, welche (die eine umfaßt 856—869, die andere 881—884) in dieser Tabelle vorkommen, sind auch Injektionen in die Carotis gehirnwärts und zentralwärts eingeschlossen. So gemachte Injektionen gehören allerdings den folgenden Abschnitten an und werden da besprochen, aber sie sind doch hier eingeführt um das Resultat dieser Injektionen mit den Aortainjektionen leicht vergleichen zu können.

Wir sehen nun, daß nicht nur diejenigen Dosen, welche in die Carotis zentralwärts schnell töten (859), symptomlos (858) vertragen werden, sondern auch, daß zudem dieselben Mengen, die bei intravenöser Injektion den anaphylaktischen Schock in einigen Minuten hervorrufen, in die Aorta gegeben werden können, ohne nennenswerte Störungen zu verursachen (865, 867, 869, 881, 882). Hierdurch wird es also bestätigt, daß die Abdominalorgane trotz ihrem großen Antigengehalt den Schock nach der einfachen, intravenös akut tödlichen Dosis nicht bewirken. Es ist sogar wahrscheinlich, daß die Passage durch diese Organe das Serum entgiftet; nach dem Zurückkehren in das rechte Atrium ist es nämlich nicht mehr imstande, den Schock auszulösen. Doch

Digitized by Google

muß man sich dabei erinnern, daß das toxische Serum während der obenerwähnten Passage mit beinahe der ganzen Blutmenge des Körpers verdünnt wird und daß durch diese Konzentrationsverminderung auch die Inaktivität des Serums möglicherweise erklärt werden könnte. (Vergleiche damit, daß bei langsamer Injektion die Tiere auch intravenös die bei schneller Injektion tödliche Dosis vertragen können. Friedberger.)

IV. Die Rolle des Gehirns für die Entwickelung des Schockes nach der einfachen, intravenös akut tödlichen Dosis bei der umgekehrten Anaphylaxie.

Bekanntlich wirkt bei der gewöhnlichen Anaphylaxie die intracerebrale Reinjektion beinahe ebenso stark wie die intravenöse. Dies ist von Besredka als ersten nachgewiesen und von mehreren Seiten bestätigt worden. Im Gegensatz hierzu kann man mit der intravenös, akut tödlichen Dosis, in die Gehirnsubstanz injiziert, bei der umgekehrten Anaphylaxie überhaupt keinen Schock auslösen, wie von mir oben gezeigt worden ist. Sterben die Tiere nach solchen Injektionen, so sterben sie nicht am Schock, sondern aus anderen Ursachen, welche ich schon näher besprochen habe. Aber obwohl es sich so verhält, wäre es doch denkbar, daß das toxische Serum bei der umgekehrten Anaphylaxie von den Gehirngefäßen aus den Schock bewirken könnte. Dies habe ich in der Weise untersucht, daß ich meine toxischen, hammelhämolytischen Sera in die Carotis gehirnwärts eingespritzt habe.

Dabei ging ich folgendermaßen vor: Nach Bloßlegen der Carotis commun. wurde zentralwärts das Gefäß unterbunden, mit einem scharfen Messer in die Gefäßwand ein longitudinaler Schnitt gemacht und hierdurch eine stumpfe Kanüle weit hinauf bis in die Nähe von der Teilungsstelle der Carotis eingeführt. Um das Gefäß herum mit der einliegenden Kanüle wurde eine Ligatur gelegt, um das Zurückfließen der Flüssigkeit bei den Injektionen zu verhindern.

Die in jedem Falle zur Injektion abgemessene Serummenge wurde hier, wie immer bei intravasalen Injektionen, mit 0,8% 37° NaCl-Lösung bis 1 ccm. aufgefüllt. Dieses Quantum wurde in 5—7 Sekunden injiziert und in demselben Moment, da die Kanüle ausgezogen wurde, band ich die Ligatur kräftig an und hinderte so jedes Zurückfließen der injizierten Flüssigkeit. Wo nichts anderes gesagt wird, hatte die Injektionsflüssigkeit eine Temperatur von ungefähr 25°.

Digitized by Google

Tabelle VIII.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Minimale, intravenös akut tödliche Dosis	Injizierte Serumdosis	Resultat
497	365	423 inaktiv	0,04 ccm pro 100 g Tier	0,04 ccm pro 100 g Tier	Schnelles Atmen. Einige Zuckungen. Überlebt.
498	315	423	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	„ „ „ „ „
507	310	423	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	„ „ „ „ „
522	315	487 inaktiv	0,05 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „	„ „ „ „ „
765	430	704 aktiv	0,04 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	Injektion in linke Carotis. Körper und Kopf links gedreht. Springende, anhaltende Krämpfe. † in 30 Min.
766	390	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,02 ccm „ 100 g „	Wie 765. † in 60 Min.
767	360	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „	Keine Symptome.
876	245	704 inaktiv	0,055 ccm „ 100 g „	0,055 ccm „ 100 g „	Injektion in linke Carotis. Die Injektionsflüssigkeit 37°. Körper und Kopf nach links gedreht. † in 10 Min. Typ. Anaphylaxie.
818	445	757 aktiv	0,08 ccm „ 100 g „	0,08 ccm „ 100 g „	Injektion in linke Carotis. Körper und Kopf nach links gedreht, durch anhaltende, springende Krämpfe geschüttelt; linksseitiger Exophthalmus. Linksseitige Manègebewegung. † in 50 Min.
819	370	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,03 ccm „ 100 g „	Injektion in rechte Carotis. Ganz wie 818 nur, daß alles, was da linksseitig war, hier rechtsseitig ist. † in 60 Min.
828	320	757	0,035 ccm „ 100 g „	0,035 ccm „ 100 g „	Ganz wie 818, † in 23 Min.
829	300	757	0,035 ccm „ 100 g „	0,035 ccm „ 100 g „	Die Flüssigkeit bis 37° erwärmt. Schwache Resp.-Störungen. Überlebt.
880	345	757	0,035 ccm „ 100 g „	0,04 ccm „ 100 g „	„ „ „ 37° „ „ „ „
888	385	757 inaktiv	0,05 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „	„ „ „ 37° „ Keine Symptome.
848	410	757	0,05 ccm „ 100 g „	0,05 ccm „ 100 g „	„ „ „ 37° „ Schnelles Atmen; übrigens nichts.
871	280	561	Typhusagglut. Kaninchenserum aktiv	1 ccm	Injektion in linke Carotis. Das Serum nur 4°. Körper rechts gedreht, Zuckungen; bewegt sich eine kurze Stunde nach rechts. Überlebt.
872	320	561	„ „ „	0,5 ccm	Injektion in linke Carotis. Serum bis 37° gewärmt. Keine Symptome.
890	310	561	„ „ „	1 ccm	„ „ „ „ „ „ 37° „ „ „
887	280	561	„ „ „ inaktiv	1 ccm	„ „ „ „ „ „ 37° „ „ „
870	340		Frisches, normales, aktives Kaninchenserum.	1 ccm	„ „ „ „ „ „ 37° „ „ „
957	365	604	Ochsenhämolytisches Kaninchenserum	1 ccm	Serumtiter für Hammelblut 0,008.

Digitized by Google

Vier hammelhämolytische Sera sind nun in dieser Weise geprüft, nämlich die Sera 423, 487, 704 und 757, darunter die beiden letztgenannten sowohl aktiv wie inaktiv. Alle die Sera sind aus den früheren Versuchen bekannt. Zudem sind auch ein typhusagglutinierendes Kaninchenserum mit einem Titer von 30 000 und ein ochsenhämolytisches Kaninchenserum mit einem Titer gegen Ochsenblut von 3300 und gegen Hammelblut von 300 benutzt.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß von den drei inaktiven Sera 423, 487 und 757 (Tiere 497, 498, 507, 522, 833, 843) diejenigen Dosen, welche intravenös die Tiere akut, d. h. in 5—10 Minuten, unter dem Bilde des anaphylaktischen Schockes töten, entweder gar keine oder nur sehr schwache anaphylaktische Symptome hervorrufen, wenn sie anstatt intravenös in die Carotis injiziert werden. Bedenkt man, daß von der gewählten Injektionsstelle aus das Serum dem Gehirn in einer Menge und in einer Konzentration zugeführt wird, welche derjenigen nach den gewöhnlichen, intravenösen Injektionen weit überlegen ist — und dies trifft wahrscheinlich auch da zu, wo ich wie beim Tier 767 nur 0,01 ccm pro 100 g Tier intracarotal ohne jegliche Folgen injizierte —, so ist damit bewiesen, daß das Gehirn und dessen Gefäße keine primäre Bedeutung für den anaphylaktischen Schock hat. Im Gegenteil wird das toxische Serum durch die Gehirnpassage so abgeschwächt, daß die intravenös akut tödliche Serumdosis, intracarotal injiziert, wenn sie aus den Kopfvenen zurückkommt, nicht mehr imstande ist, den Schock zu bewirken. Beim Serum 704 inaktiv (Tier 876) findet man indessen keine Verminderung der Serumwirkung nach intracarotaler Injektion, sondern das Serum tötet durch Anaphylaxie in derselben Dosis, wenn es entweder intravenös oder intracarotal gegeben wird. Dieser Befund spricht nicht gegen die erstgenannten, denn wäre der Schock von den Gehirngefäßen ausgelöst worden, so wäre die schockerzeugende Dosis intracarotal kleiner als intravenös gewesen, was, wie gesagt, nicht der Fall ist.

Das Serum 704 ist also von den anderen eben erwähnten Sera verschieden, trotzdem daß alle diese Sera in derselben Weise bei Kaninchen bereitet sind; ein Verhältnis, wozu wir ja viele Parallelen in dem verschiedenen Gehalt von z. B. Nebenhämolysinen[1]) bei den hämolytischen Sera haben.

[1]) Forssman, Diese Zeitschr. 77.

Digitized by Google

Die aktiven Sera 704 und 757 weisen aber zudem eine ganz eigenartige Wirkung auf, wie aus der Tabelle betreffs der Tiere 765, 766, 818, 819 und 828 hervorgeht. Hier werden der Kopf und der Körper nach der Seite gedreht und gebogen, im allgemeinen aber nicht ausnahmslos nach derjenigen Seite, deren Carotis für die Injektion angewandt worden ist. Krämpfe, welche den ganzen Körper in die Luft warfen, erschüttern das Tier, setzen gleich nach der Injektion ein und können bis zum Tode sich fortsetzen; dabei verliert das Tier doch nicht das Gleichgewicht, sondern steht auf seinen Füßen. Diese Phänomene haben nichts gemeinsam mit den allgemein bekannten anaphylaktischen Symptomen.

Sie werden nur dann beobachtet, wenn die Sera Zimmertemperatur oder darunter besitzen; bis 37° erwärmtes Sera (829, 830) hatten nicht dieselben Resultate.

Eine Andeutung hierzu habe ich doch auch bei einem anderen Serum (561), einem typhusagglutinierenden Serum, gesehen, das kühl in die Carotis injiziert wurde, aber die Wirkung war bei weitem nicht so ausgesprochen oder anhaltend wie bei den hammelhämolytischen. Die Symptome sind wohl als die Folgen von der direkten Einwirkung der hammelhämolytischen Sera auf die Nervenzellen anzusehen.

Diejenigen hammelhämolytischen Sera, welche wie z. B. ochsenhämolytisches Serum intravenös nicht toxisch für Meerschweinchen sind[1]), bewirken auch intracarotal keine Vergiftungssymptome.

Ich möchte jetzt unter Hinweis auf die obenstehenden Versuche die anfangs aufgestellte Frage beantworten: Tragen alle oder nur vereinzelte Organe zu demjenigen Shock bei, der durch eine einfache, intravenös, akut tödliche Serumdosis ausgelöst wird?

Dabei muß daran erinnert werden, daß in den vorigen Abschnitten erwiesen ist erstens, daß der Schock nur von den Gefäßen ausgelöst werden kann; zweitens, daß dieser Schock nicht von den Bauchorganen herrührt, denn, injiziert man tief in die Aorta — in der Höhe zwischen der 3. und der 4. Rippe — die intravenös, akut tödliche Serumdosis, so kommt dadurch kein Schock zustande, sondern die so

[1]) Forssman und Fex, Diese Zeitschr. 61.

Digitized by Google

injizierten Tiere überleben, nur höchstens unbedeutende Krankheitssymptome zeigend, welche Symptome als Folgen von Serumspuren, welche nach Passage der Bauchorgane dem Herz zurückgeführt werden, aufgefaßt werden sollen, und drittens, daß auch dem Gehirn keine schockerzeugende Eigenschaft bei der genannten Serumdosis zukommt.

Wenn man nun das toxische Serum wie gewöhnlich in die Vena jugularis einspritzt, so muß es folglich, von diesem Punkt gerechnet, bis es mit dem Blute die erwähnte Höhe (3.—4. Rippe) der Aorta erreicht, in einen schockbewirkenden Gefäßbezirk eines Organes hineinkommen. Es fragt sich indessen, ob man nicht diese Strecke noch mehr begrenzen kann. Zu diesem Zwecke habe ich Seruminjektionen direkt in den linken Ventrikel des Herzens gemacht, und zwar mit folgendem Resultat (Tab. IX).

Tabelle IX.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Injektionsstelle	Injizierte Dosis	Resultat
909	330	757	V. jugular.	0,04 ccm pro 100 g Tier	† in 4 Min. Typ. Anaphylaxie.
911	415	757	„ „	0,035 ccm „ 100 g „	† in 20 Min. Typ. Anaphylaxie.
910	300	757	„ „	0,03 ccm „ 100 g „	Überlebt. Ernste anaphylaktische Respirationsstörungen.
924	300	757	Linke Herzventrikel	0,04 ccm „ 100 g „	† in 8 Min. Respirationsstörungen. Keine Blutung im Perikardium.
926	255	757	„	0,03 ccm „ 100 g „	Überlebt. Ernste Anaphylaxie. Respirationsstörungen.
925	270	757	„	0,02 ccm „ 100 g „	Eine unbedeut. Spur von Manège. Überlebt. Keine anaphylaktische Symptome.

Wie man sieht, wirkt das Serum genau ebenso kräftig, wenn es in den linken Ventrikel wie wenn in die Vena jugularis eingespritzt wird. Hieraus kann jedenfalls die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das Serum, um den Schock bei der umgekehrten Anaphylaxie zu erzeugen, nicht die Arteria pulmonalis und ihre Verzweigungen passieren muß, sondern daß es ebensogut geht, den Schock auf der Strecke des linken Ventrikels bis zu der erwähnten Höhe der Aorta hervorzurufen. Auf dieser Strecke werden folgende Äste abgegeben, welche berücksichtigt werden müssen: 1. die Coronaräste, 2. der Truncus anon, 3. die Arter. subclavia sin. und 4. die Bronchial- und einige Intercostalarterien. Von diesen habe ich den Truncus teils oben — betreffs der Caro-

Digitized by Google

tis — teils in einem folgenden Aufsatz [1]), auf den ich hinweise — betreffs der Art. vertebralis und der subclavia — behandelt und gezeigt, daß der typische Schock von diesem Gefäßbezirk nicht kommt; ebensowenig stammt er von der Art. subclav. sin., denn ihr Vertebralzweig kann in dieser Beziehung kaum anders als Vertebral. dextr. sich verhalten; es bleiben dann nur die Coronar- und Bronchialarterien übrig (die Intercostalen können nicht in die Rechnung einbezogen werden) und hier muß man den Ursprung des Schockes suchen.

Die Antwort auf die gestellte Frage wird also, daß der Schock im Gefäßgebiet von den Art. coron. cordis oder von den Bronchialarterien bei der einfachen, intravenös akut tödlichen Serumdosis seine Herkunft hat und daß die Symptome, welche von anderen Organen stammen, sekundär sind. Ob diese beiden Gebiete oder nur das eine und sodann, welches als Schockquelle fungiert, das wird später untersucht werden.

Unter den übrigen Ergebnissen dieser Untersuchung möchte ich noch hervorheben, daß die Leber die Eigenschaft hat, das toxische Serum zu entgiften, daß sogar das Gehirn bei den meisten Sera eine entgiftende Wirkung ausübt und daß nach Nierenexstirpationen die Tiere unempfindlich gegen die einfache, intravenös akut tödliche Serumdosis werden, was von einer Retention der sonst durch die Nieren sezernierten Sekretionsprodukte abhängt.

[1]) Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektionen. Diese Zeitschrift **110**, 164. 1920.

Digitized by Google

Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektionen.

Von
J. Forssman.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 7. Juli 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Nachdem ich im Anfange meiner Untersuchung über den Ursprung des anaphylaktischen Schockes [1]), eine Serie Injektionen vom Serum in die Carotis gehirnwärts gemacht hatte, dachte ich einige zentralwärts gerichtete Injektionen in die Carotis vorzunehmen, in der Absicht, das Serum in die Aorta einzubringen, in dieser bequemen Weise das Gehirn, das Herz und die Lungen zu umgehen und so die Bedeutung der Bauchorgane für den Schock zu studieren. Dabei bekam ich aber ein unerwartetes und bisher ganz unbekanntes Krankheitsbild, das in keiner Beziehung mit dem anaphylaktischen Schock übereinstimmte. Daß es nicht die Folge einer Einwirkung des Serums auf die Bauchorgane ist, beruhte, brauche ich jetzt, da schon die Rolle dieser Organe in meiner vorerwähnten Arbeit eingehend besprochen ist, nicht zu sagen. Ich möchte nun die Ergebnisse, welche ich in diesem Punkte bekommen habe, mitteilen und über die verwickelten Verhältnisse, welche uns hier begegnen, soweit ich sie augenblicklich zu übersehen vermag, berichten.

Zuerst doch einige Worte über die Anordnung und Ursprung der Carotis comm. beim Meerschweinchen. Von der Aorta geht der Truncus anonym. aus, der von wechselnder Länge bei verschiedenen Tieren ist Er teilt sich in den zwei Carotid. comm., von denen die linke die dünnere ist. Die rechte gibt gleich die Art. subclav. dextra ab oder es zweigt sich diese direkt vom Truncus ab. Die Art. subclav. sin. geht direkt von der Aorta aus. Die Art. vertebr. auf beiden Seiten sind Äste von der Art. subclav.

Auf der ganzen Strecke vom Truncus bis zur Teilung in Carotis extern. und interna gibt Carotis comm., soweit ich sehen konnte, keine Äste ab. Ich habe den Arcus aortae mit ihren obengenannten Ästen nach der Natur auf den beiden beistehenden Skizzen gezeichnet.

Beim Bloßlegen der Carotis comm. beim lebenden Tiere geht es nicht bis zu ihrem Aufspalten bis auf den Truncus hinunterzukommen. Man

[1]) Diese Zeitschr. **110**, 133. 1920.

Digitized by Google

kommt nur ungefähr so weit, wie ich es auf den Skizzen mit einem Querstriche markiert habe. Um nun die Injektionen vorzunehmen, bin ich genau so vorgegangen, wie es für die Injektionen, tief in die Aorta, in der zitierten Arbeit beschrieben worden ist, nur daß ich hier eine gerade Kanüle verwandte und sie nicht tief herunter einführte.

In Tabelle I habe ich nun einige Serien solcher Injektionen zusammengestellt. Die hier angewandten Sera sind uns aus den Tab. I—VIII meiner vorigen Arbeit schon bekannt. Ich habe allerdings noch mehrere hammelhämolytische Sera in dieser Weise geprüft, da sie aber alle dasselbe Resultat gegeben haben, habe ich sie nicht hier aufgenommen, um nicht die Tabelle unnötigerweise zu verlängern.

In der Tabelle habe ich mich beschränkt, unter den „Resultaten" ganz kurz diejenigen Symptome zu erwähnen,

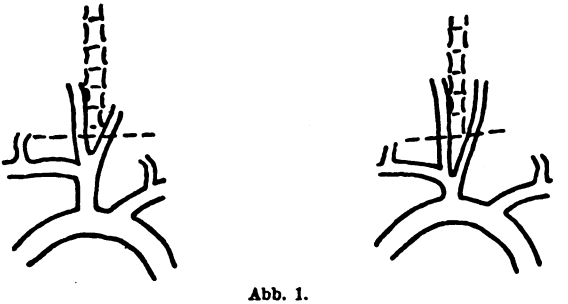


Abb. 1.

welche die in die Carotis zentralwärts injizierten Tiere darboten. Ich will nun, um das Bild zu vervollständigen, die verschiedenen Phänomene ausführlicher besprechen als wie man es tabellarisch machen kann.

Das erste, was beim Durchsehen der Tabelle auffällt, ist, daß die Tiere nach den carotis-zentralwärts gerichteten Injektionen schon nach viel kleineren Dosen als intravenös sterben, ja nach Dosen, welche gar keine krankhaften Symptome hervorrufen, wenn sie intravenös gegeben werden[1]).

[1]) Ich habe Tiere aus anderen Zuchten gesehen, welche noch viel sensibler gegen diese Injektionen waren als diejenigen, welche ich im hiesigen Institut hatte. Bei einer Demonstration vor einigen Kopenhagener Kollegen, wo ich das Serum 704 benutzte, zeigte sich nämlich, daß die da befindlichen Meerschweinchen ungefähr 6 mal empfindlicher waren als die meinigen, so daß ich da mit 0,0015 ccm pro 100 g Tier denselben Effekt wie hier nach 0,01 ccm pro 100 g erhielt.

Digitized by Google

Tabelle I.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum Nr.	Minimale, intravenös akut tödliche Serumdosis	Die größte Dosis, welche die Tiere eben überlebten	Die größte Dosis, die ohne Symptome vertragen wurde	Injizierte Serumdosis	Resultat
524	295	487	0,05 ccm pro 100 g	0,04 ccm pro 100 g	0,025 ccm p. 100 g	0,02 ccm pro 100 g	† in 20 Min. Fast momentan ganz gelähmt. Strabism. Keine Respirationsstörungen.
525	305	487	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	0,025 ccm „ 100 g	0,01 ccm „ 100 g	† in 1 Std. Manège nach links. Rollt später über den Fußboden hinweg. Strabism. Keine Krämpfe.
527	275	487	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	0,025 ccm „ 100 g	0,01 ccm „ 100 g	† in 40 Min. Fast momentan ganz gelähmt. Strabism.
528	265	487	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	0,025 ccm „ 100 g	0,002 ccm „ 100 g	Gesund. Keine Symptome.
584	260	570	0,12 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	Überlebt. Manège nach rechts während 1 Stunde, dann gesund.
738	440	704	0,04 ccm „ 100 g	0,02 ccm „ 100 g	—	0,02 ccm „ 100 g	† in 38 Min. Manège nach links. Tiefe, angestrengte Respiration, Liegt endlich auf der linken Seite, lebhaft die Beine bewegend, wie im Laufe. Strabism.
768	405	704	0,04 ccm „ 100 g	0,02 ccm „ 100 g	—	0,01 ccm „ 100 g	† in 8 Std. Ruhiges Atmen. Strabism. Gelähmt.
802	380	704	0,04 ccm „ 100 g	0,02 ccm „ 100 g	—	0,01 ccm „ 100 g	† in 4 Std. Ruhiges Atmen. Strabism. Manège nach links.
769	440	704	0,04 ccm „ 100 g	0,02 ccm „ 100 g	—	0,005 ccm „ 100 g	Überlebt. Rollt quer über das Zimmer. Strabism. In einer Stunde wieder normal.
888	320	704 (inakt.)	0,055 ccm „ 100 g	—	—	0,018 ccm „ 100 g	† in 8 Min. Fast momentan gelähmt. Strabism. Ruhiges Atmen. Stirbt mit starkem Lungenödem.
821	330	757 (aktiv)	0,04 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	—	0,01 ccm „ 100 g	† in 20 Min. Manège nach rechts. Strabism. Ruhiges Atmen.
823	290	757	0,04 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	—	0,01 ccm „ 100 g	† in 10 Min. Manège nach rechts. Strabism. Ruhiges Atmen.
834	330	757 (inakt.)	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	—	0,017 ccm „ 100 g	† in 17 Min. Manège nach l. Rollt. Strabism. Ruhiges Atmen.
835	345	757	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	—	0,017 ccm „ 100 g	† in 13 Min. Manège nach rechts. Rollt. Strabism. Rechtes Auge exophthalmus, ohne Cornealreflexe. Linkes Auge norm.
844	340	757	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	—	0,017 ccm „ 100 g	† in 10 Min. Manège nach rechts. Linkes Auge Exophthalmus, ohne Cornealreflex. Rechtes Auge normal. Strabism. Stirbt mit Lungenödem. Respiration wie bei Anaphylaxie.
845	400	757	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	—	0,017 ccm „ 100 g	† in 10 Min. Ganz wie bei 844, aber mit den Augen verhält es sich ganz umgekehrt wie da.
859	320	757	0,05 ccm „ 100 g	0,04 ccm „ 100 g	—	0,017 ccm „ 100 g	† in 10 Min. Manège nach links. Rechtes Auge Exophthalmus, ohne Cornealreflex. Strabism.
898	320	757 (aktiv)	0,045 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	—	0,015 ccm „ 100 g	† in 15 Min. wie 859.
917	280	757	0,045 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	—	0,005 ccm „ 100 g	† in 4 Std. Manège nach links. Strabism. Keiner Exophthalm. Cornealreflex beibehalten.
918	290	757	0,045 ccm „ 100 g	0,08 ccm „ 100 g	—	0,008 ccm „ 100 g	Überlebt. Gesund, keine Symptome.
526	300	Frisch. Hammelser.	—	—	—	1 ccm	Schnelles Atmen; übrigens nichts.
609	270	Frisches Kaninchenserum	—	—	—	1 ccm	Gesund, keine krankhaften Symptome.
889	340	Typhusagglutin. Kaninchenserum	—	—	—	1 ccm	Gesund, keine krankhaften Symptome, Serum 561.
960	320	Oehsenhämol. Kaninchenserum	—	—	—	1 ccm	Gesund, keine krankhaften Symptome, Serum 604.

Digitized by Google

Dasjenige Symptom, welches das Krankheitsbild beherrscht oder jedenfalls am stärksten hervortritt, ist zweifelsohne die Gleichgewichtsstörung. Davon sieht man allerdings nichts in denjenigen Fällen, wo eine Parese beinahe der ganzen Körpermuskulatur eintritt, wo die Tiere deswegen ganz unbeweglich, aber noch ruhig atmend auf der Unterlage liegen. Dies kommt nämlich vor allem bei größeren Dosen vor, welche sich den intravenös akut tödlichen (524, 883) nähern, bisweilen, doch selten, auch bei kleineren Injektionen (527). Sonst weisen alle mehr weniger entwickelte Gleichgewichtsstörung auf. Sie äußert sich entweder nur darin, daß das Tier nicht gerade, sondern nur im Zirkel gehen kann, also eine Manègebewegung, oder bei kräftiger Entwicklung des Symptomes so, daß das Tier gar nicht auf seinen Füßen stehen kann. Es dreht sich nicht nur nach der einen Seite, sondern auch um seine Längsachse, so daß die Hinterfüße gegen den Fußboden, die Vorderfüße gegen das Dach gerichtet sein können. Da das Tier gleichzeitig die Beine immerfort lebendig bewegt, kommt es leicht dazu, daß es sehr schnell über den Fußboden hinweg quer über das ganze Zimmer rollt. Solche Tiere leben, wie aus der Tabelle hervorgeht, oft mehrere Stunden und können, wenn sie nicht durch Gegenstände in ihren Rollbewegungen gehindert werden, immerfort bis zum Tode rotieren. Eins dieser Tiere, das ich in einem Körbchen aufbewahrte, rotierte immerfort während 3 Stunden; durch Kratzen an den unebenen Wänden des Körbchens vermag es nämlich die Rotation zu unterhalten. Die Rotation erfolgt dabei bei dem einen Tier nach links bei dem anderen nach rechts, ohne daß ich die Ursache hierzu habe auffinden können. Von 821 und 823, welche beide Manègebewegungen nach rechts aufwiesen, waren 821 in die linke, 823 in die rechte Carotis injiziert.

Zusammen mit der Gleichgewichtsstörung und vielleicht als deren Ursache findet man auch regelmäßig Augenstörungen. Des öfteren sieht man, daß das eine Auge nach oben oder nach vorne gerichtet ist, das andere dagegen nach unten oder nach hinten. Dies habe ich mit dem Namen Strabismus in der Tabelle bezeichnet. Zudem sah es aus, als ob das eine Auge dabei erblindet war, indem das Tier sich nicht zurückzog, wenn man dem einen Auge plötzlich Gegenstände näherte, was es dagegen beim ähnlichen Vorgehen mit dem anderen Auge

Digitized by Google

tat. Auch in denjenigen Fällen, wo die Tiere wegen zu großer Dosen Serum gelähmt waren und deshalb keine Gleichgewichtsstörung aufwiesen (524, 527, 768), trat doch der Strabismus auf.

Bisweilen kommt auch Exophthalmus und ein Wegfallen des Cornealreflexes des einen Auges vor. Das habe ich indessen nur beim Serum 757 gesehen. Ob dies nur als eine Steigerung der Augensymptome aufzufassen ist oder als eine Eigentümlichkeit des Serums 757, dazu kann ich mich jetzt nicht äußern.

Von den gewöhnlichen anaphylaktischen Symptomen sieht man entweder nichts oder jedenfalls sehr wenig. Krämpfe kommen gar nicht vor; oft ist das Atmen ruhig bis zum Tode, eher langsam als schnell; einige Tiere (844, 845) wiesen doch einen Atmungstypus auf wie bei der Anaphylaxie. In Übereinstimmung hiermit sehen wir auch, daß einige mit Lungenödem starben und bei der Sektion wurde dann Lungenaufblähung gefunden, im allgemeinen aber scheint es, als ob die Tiere an Herzparese sterben und bei der Sektion sieht man weder im Gehirn noch in den übrigen Organen makroskopische Veränderungen, vielleicht einige kleine Hämorrhagien in den Lungen.

Nachdem wir nun diesen eigentümlichen Symptomenkomplex kennengelernt haben, bleibt die erste Frage: ist er spezifisch? Man muß nämlich bedenken, daß beim Meerschweinchen Gleichgewichtsstörungen nicht allzu selten vorkommen. Ich habe mitunter gesehen, wie z. B. nach großen, aber nicht tödlichen Blutentnahmen durch Herzpunktion die Tiere mehrere Umdrehungen machten, zweifelsohne eine Folge der Anämie. Das ist aber immer ein schnell vorübergehendes Phänomen.

Daß es hier eine spezifische Reaktion ist, sieht man aus den folgenden Tatsachen. Erstens daran, daß normales Kaninchenserum (609) und normales Hammelserum (526) in großen Dosen (von 1 ccm) keine ähnliche Wirkung haben, ebensowenig wie hochwertige Immunsera von Kaninchen (889, 959), darunter auch ein solches, welches heterologe Hammelhämolysine enthielt (959) und zweitens daran, daß gewöhnliche hammelhämolytische Sera und durch Meerschweinchenorganinjektionen erhaltene hammelhämolytische Sera

Digitized by Google

regelmäßig in geeigneten Dosen diesen Symptomenkomplex bewirken.

Hierzu kommt noch, daß, wie darauf eingerichtete Absorptionsversuche lehrten, die hier wirksame Substanz von Meerschweinchennierenemulsion zusammen mit dem anaphylaxieerregenden Stoff spezifisch absorbiert wird.

Hier möchte ich auch auf die naheliegende Frage antworten, ob denn nicht was ähnliches bei der gewöhnlichen Anaphylaxie vorkomme. Zu diesem Zweck habe ich eine Reihe Meerschweinchen mit Pferdeserum subcutan injiziert und 22 Tage später mit Pferdeserum reinjiziert. Es erwies sich dann, daß die tödliche Dosis ganz dieselbe war, entweder sie intravenös oder in die Carotis zentralwärts gegeben wurde, daß die Symptome dieselben waren und daß demnach bei der gewöhnlichen Anaphylaxie durch intracarotale Injektionen zentralwärts kein solches Symptomenkomplex wie bei der umgekehrten Anaphylaxie hervorgerufen werden kann.

Diejenige Substanz, welche bei der umgekehrten Anaphylaxie nach intracarotalen Injektionen das betreffende Symptomenkomplex veranlaßt, entsteht folglich während des Immunisierungsprozesses und ist für die genannten hammelhämolytischen Sera spezifisch.

Ist diese Substanz denn identisch mit derjenigen, welche intravenös injiziert, den anaphylaktischen Schock bewirkt oder nicht?

Daß der beschriebene Symptomenkomplex nie, weder nach intravenösen, noch nach in die linke Herzkammer gemachten Injektionen hammelhämolytischer Sera beobachtet wird, trotzdem daß man dabei 5—9 mal größere Dosen gibt, braucht nicht die Verschiedenheit der Substanzen zu beweisen. Dies kann nämlich auch so erklärt werden, daß bei den intracarotalen Injektionen die aktive Substanz gewisser Zellgruppen, welche den Symptomenkomplex beherrschen, in viel größerer Konzentration zugeführt wird als von anderen Injektionsstellen her, und daß hierdurch das ganz andersartige Resultat herrührt.

Aber die Verschiedenheit scheint durch andere Umstände wahrscheinlich zu sein. Zuerst möchte ich auf die Versuche 584 und

Digitized by Google

917 hinweisen. Hier sieht man, daß kein konstantes Verhältnis zwischen der intravenös, akut tödlichen Dosis und der intracarotal zentralwärts tötenden existiert. Beim Serum 570 (584) erliegt das Tier nicht einem Drittel der intravenös tödlichen Dosis, während beim Serum 757 schon $^1/_9$ tötet. Wären die Substanzen identisch, so müßte doch ein konstantes Verhältnis zwischen ihnen bestehen. Und weiter: Bei der umgekehrten Anaphylaxie gelingt es leicht, wie schon oben ausführlich erwähnt ist, eine deutliche Antianaphylaxie hervorzurufen, die ja am einfachsten dadurch zustande kommt, daß man eine untertödliche Dosis intravenös injiziert. Ein solches Tier, das mehr als $1^1/_2$ mal die sonst akut tödliche Dosis symptomlos intravenös verträgt, wiedersteht nicht besser als ein unbehandeltes Tier der tödlichen intracarotal zentralwärts gerichteten Injektion. Eine Antianaphylaxie gegen diese Injektion hat sich also nicht gleichzeitig mit dem Entstehen der übrigen Antianaphylaxie entwickelt. Ebensowenig entsteht eine erhöhte Resistenz gegen die intracarotalen zentralwärts gerichteten Injektionen durch doppelseitige Nierenexstirpation, welche, wie wir wissen, eine Unempfindlichkeit gleich der Antianaphylaxie gegen die intravenösen Injektionen macht[1]).

Nach alledem glaube ich bis auf weiteres, daß diejenige Substanz, welche den besprochenen eigentümlichen Symptomenkomplex veranlaßt, verschieden von der intravenös tödlichen Substanz und als eine neue Immunsubstanz aufzufassen ist.

Von wo wird denn dies eigenartige Krankheitsbild ausgelöst?

Wahrscheinlich vom Kleinhirn, falls wir nämlich die verschiedenen Symptome auf ein Organ zurückführen wollen. Es ist dabei nur auffallend, daß derselbe Symptomenkomplex nur ausnahmsweise und sehr unvollständig nach Injektionen in die Carotis gehirnwärts sich entwickelt, während er, wie gesagt, regelmäßig und bei allen den genannten hammelhämolytischen Sera hervortritt, wenn das Serum in die Carotis zentralwärts injiziert wird. Bei Lösung dieses Rätsels muß erst berücksichtigt werden, auf welchem Wege das Serum bei den intracarotalen

[1]) Diese Zeitschr. **110**, 147. 1920.

Digitized by Google

Injektionen zentralwärts dem Kleinhirn zugeführt wird. Wie ich oben schon gesagt habe, dachte ich im Anfang meiner Untersuchung, von der Carotis aus das Serum hinunter in die Aorta zu pressen und mit einem sehr kräftigen Druck wäre dies wahrscheinlich möglich gewesen. Da ich aber hierbei so schwachen Druck benutzte, daß es 5—7 Sekunden dauerte um eine 1 ccm fassende Spritze zu injizieren, so kann das Serum so weit wie in die Aorta nicht kommen. Schon im Truncus begegnete die injizierte Flüssigkeit dem gewaltigen Blutstrom aus der Aorta und wird hierdurch mitgerissen. Steht dann die andere Carotis commun. offen, geht ein Teil durch diese, das übrige durch Subclavia dextra und weiter durch Vertebralis nach oben; ist auch die andere Carotis commun. unterbunden, geht die ganze Masse in Subclavia dextr. und dann teilweise durch Vertebralis nach dem Kleinhirn. Wenn man die beiden Carotis commun. oben unterbindet und dann Serum zentralwärts in die eine Carotis commun. injiziert, so tritt ganz wie bei den anderen Injektionen in die Carotis zentralwärts das beschriebene Krankheitsbild mit der Gleichgewichtsstörung usw. gleich ein. Dann sucht sich das Serum, wie oben gesagt, nach dem Kleinhirn durch die Vertebralis dextr. einen Weg.

Bedenkt man nun, daß das Kleinhirn vorzugsweise durch die Art. vertebr. mit Blut versorgt wird und daß bei Injektionen in die Carotis gehirnwärts beinahe nichts, bei Injektionen in die Carotis zentralwärts weit mehr von der injizierten Flüssigkeit als aus irgendeiner anderen Injektionsstelle durch Vertebralis dextr. emporgeht, so ist es wahrscheinlich, daß der eigenartige Symptomenkomplex, welcher nach Injektionen in die Carotis zentralwärts hervortritt, eben das Resultat davon ist, daß das toxische Serum in einer Konzentration wie sonst nie dem Kleinhirn und den da befindlichen Zellgruppen zugeführt wird, durch deren Reaktion mit dem Serum der Symptomenkomplex dann ausgelöst wird.

Doch, noch ein anderer Faktor kann möglicherweise hinzukommen. Bei den Injektionen in die Carotis zentralwärts wird das Serum vor dem Einströmen ins Kleinhirn mit großen Blutmengen, denen es in Truncus begegnet, vermischt, während das gehirnwärts injizierte Serum nur allmählich mit Blut in Berührung kommt, da es ja in die unten unterbundene Carotis nach

Digitized by Google

oben hineingespritzt wird. Wenn nun das Blut eine aktivierende Einwirkung auf das Serum ausübte, so würde das zentralwärts injizierte Serum, das gleich mit viel Blut vermischt wird, eine kräftigere Aktivierung erfahren, als das andere, gehirnwärts injizierte, was das verschiedene Resultat zwischen gehirnwärts und zentralwärts gemachten Injektionen erklären könnte.

Beim Versuche festzustellen, ob wirklich die Blutmischung die genannte Bedeutung habe, habe ich es mehrmals so gemacht, daß ich die bestimmte Serummenge, z. B. 0,2 ccm, in die Spritze aufzog, dann die Spritze bis 1 ccm mit Blut aus der Carotis durch Aspiration füllte, das ganze gut mischte und endlich in die Carotis gehirnwärts injizierte. In einem Falle habe ich dabei als Resultat Gleichgewichtsstörungen und Tod, aber keinen Strabismus mit einer Serumdosis bekommen, welche mit 0,8 proz. NaCl-Lösung bis 1 ccm aufgefüllt, gar keine Symptome machte; in anderen Fällen aber habe ich nichts von Aktivierung gesehen. Da indessen diejenige Blutmenge, welche in dieser Weise mit dem Serum gemischt wird, klein im Vergleich mit dem Quantum, daß das Serum bei Injektion in die Carotis zentralwärts trifft, bedeuten diese Versuche nicht viel.[1])

Wenn es sich doch um eine Aktivierung der toxischen Substanz durch im Blute befindliche Stoffe handelte, schien es mir angezeigt, von denjenigen Stoffen, welche vor anderen in Frage kommen könnten, nämlich des Adrenalins und des Thyreoidins zu gedenken und habe ich deswegen geprüft, ob diese beiden Stoffe das Serum so zu verändern vermöchten, daß es in die Carotis gehirnwärts injiziert dieselbe Wirkung bekommt wie in die Carotis zentralwärts. Das ist mir mit keinem dieser Stoffe gelungen, aber ich habe doch beim Adrenalin[2]) so bemerkenswerte Resultate erhalten, daß ich sie hier in Tabellenform wiedergeben möchte.

In dieser Tabelle sind nun Seruminjektionen mit oder ohne Adrenalinzusatz in die Carotis gehirnwärts und zentralwärts zum Vergleiche aufgestellt. Zuerst wurde Adrenalin ohne Serum in

---

[1]) Ich brauche kaum zu sagen, daß, wenn man nur aspiriertes Blut ohne Serumzusatz in die Carotis gehirnwärts gibt, keine krankhaften Symptome dadurch hervorgerufen werden.

[2]) Hier wie in meiner vorigen Arbeit ist die Merksche Adrenalinlösung 1 : 1000 angewandt und die unten angegebenen Adrenalindosen beziehen sich darauf.

Digitized by Google

Tabelle II.

+ zwischen den injizierten Serum- und Adrenalindosen bedeuten, daß das Serum und die Adrenalinlösung in Mischung gegeben wurden. V und N auf demselben Platz bedeuten, daß Serum und Adrenalin jedes für sich injiziert wurde und V, daß dabei das Serum vor dem Adrenalin, N nach dem Adrenalin injiziert wurde.

Tier Nr.	Gewicht g	Serum-Nr.	Minimale, intravenös akut tödl. Serumdos.	Injizierte Serumdosis	Injizierte Adrenalinlösung	Injektions-Richtung	Resultat
729	415	—	—	—	0,025 ccm	Carotiszentralwärts.	Überlebt. Intensive-Bewegungen der Kau- und übrigen Hauptmuskeln. Langsame Respiration.
730	395	—	—	—	0,025 ccm	Carotisgehirnwärts	Überlebt. Respirationsschwierigkeiten, sehr langsame, tiefe Respiration.
891	340	—	—	—	0,005 ccm pro 100 g Tier	„	Überlebt. Heftige Muskelzuckungen, nach 16 Minuten wieder normal.
892	345	—	—	—	0,003 ccm „ 100 g „	„	Überlebt. Gar keine Intoxikationssymptome.
908	340	—	—	—	0,005 ccm „ 100 g „	Carotis zentralwärts	Überlebt. Tiefe Respiration; sonst normal.
766	390	704 aktiv	0,04 ccm pro 100 g Tier	0,02 ccm pro 100 g Tier	—	Carotis gehirnwärts	† in 60 Min. Körper und Kopf links gedreht. Springende, anhaltende Krämpfe.
767	360	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „	—	„	Überlebt. Ganz gesund.
771	380	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „ N	0,015 ccm	„	† in 20 Min. Links gedreht. Kein Strabism. Zuckungen. Stirbt mit Lungenödém.
772	420	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „ +	0,004 ccm pro 100 g Tier	„	† in 60 Min. Links gedreht. Zuckungen.
775	460	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „ +	0,004 ccm „ 100 g „	„	† in 60 Min. Links gedreht. Zuckungen.
776	420	704	0,04 ccm „ 100 g „	0,005 ccm „ 100 g „ +	0,002 ccm „ 100 g „	„	Überlebt. Zuckungen; bald wieder gesund.
894	305	757 aktiv	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „	—	„	Überlebt. Ganz gesund.
895	340	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ +	0,0035 ccm „ 100 g „	„	† in 40 Min. Links gedreht. Manège nach links. Stirbt mit Lungenödem.
900	380	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ N	0,0035 ccm „ 100 g „	„	† in 70 Min. Links gedreht. Manège: Respirat. Störungen wie bei Anaphylaxie. Lungenödem.
901	345	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ V	0,0035 ccm „ 100 g „	„	† in 90 Min. Typ. Anaphylaxie. Lungenödem.
908	385	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „ +	0,0015 ccm „ 100 g „	„	Überlebt. Links gedreht. Manège nach links.
898	320	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,015 ccm „ 100 g „	—	Carotis zentralwärts	† in 15 Min. Manège nach l. Exophthalmus. Strabism.
897	335	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,01 ccm „ 100 g „	—	„	† 25 Min. Manège. Strabism. Exophthalmus.
898	335	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,005 ccm „ 100 g „	—	„	Überlebt. Manège; bald normal.
899	355	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,003 ccm „ 100 g „ +	0,0008 ccm „ 100 g „	„	† in 82 Min. Manège nach rechts. Rollt. Strabism.
917	280	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,005 ccm „ 100 g „	—	„	† in ungefähr 10 Std. Intensive Manège. Strabism.
918	290	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,003 ccm „ 100 g „	—	„	Überlebt. Ganz normal.
919	330	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,002 ccm „ 100 g „ +	0,001 ccm „ 100 g „	„	† in ungefähr 10 Std. Intensive Manège. Strabism.
920	290	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,001 ccm „ 100 g „ +	0,001 ccm „ 100 g „	„	Überlebt; ganz normal.
921	325	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,002 ccm „ 100 g „ V	0,001 ccm „ 100 g „	„	Überlebt; ganz normal.
922	290	757	0,03 ccm „ 100 g „	0,002 ccm „ 100 g „ N	0,001 ccm „ 100 g „	„	Überlebt, augenblicklich Manège nach links, Strabism.; dauernd mehrere Stunden.

Digitized by Google

die beiden Richtungen injiziert, um zu prüfen, welche Dosen vertragen wurden. Es hat sich hierbei erwiesen, daß die Tiere ungefähr dieselben Dosen in die Carotis gehirnwärts und zentralwärts wie intravenös vertragen [vgl. diese Tabelle mit Tab. VI meiner vorigen Arbeit[1])].

Betreffs des Einflusses des Adrenalins auf die Serumwirkung bei intracarotalen Injektionen ist es aus der Tabelle ersichtlich, daß es die Serumwirkung gar nicht herabsetzt; und in dieser Beziehung stimmt es mit den Ergebnissen der intravenösen Injektionen überein[1]). Dort hatte es auch keinen verstärkenden Einfluß auf das Serum. Dies sehen wir dagegen hier, vor allem bei den Injektionen in die Carotis zentralwärts.

Die Tiere 893, 897, 898, 899 bilden eine Serie, welche mit derselben Serumverdünnung mit oder ohne Adrenalinzusatz am selben Tage injiziert wurden und ganz so verhält es sich mit einer anderen Reihe, die aus den Tieren 917—922 gebildet wird. Vergleichen wir nun 898 mit 899 und 917, 918 mit 919 und 922, so sehen wir, daß in 899 0,003 ccm Serum, d. h. ungefähr die Hälfte derjenigen Dosis, welche leicht vertragen (898) wird, durch Zusatz von nur 0,0008 Adrenalin das Tier mit den typischen Symptomen von Manège, Rollbewegung und Strabismus tötet. Und doch ist die zugefügte Adrenalinmenge nur $^1/_{20}$ der Adrenalinmenge, welche das Tier leicht überlebt. Ganz so oder noch deutlicher mit 919, wo das Tier nur $^2/_5$ der kaum tödlichen Serumdosis (917) und nur $^1/_3$ derjenigen Adrenalindosis bekam, welche ganz symptomlos vertragen wurde. Injiziert man das Adrenalin vor dem Serum, bekommt man besseren Effekt (922) als umgekehrt (921).

Wahrscheinlich liegen die Verhältnisse ebenso bei den Injektionen in die Carotis gehirnwärts. Hier habe ich ein wenig (zu) große Adrenalindosen benutzt, nicht so kleine wie bei den carotalen zentralwärts gerichteten Injektionen, und dies ist die Ursache, weshalb ich das Wort „wahrscheinlich" oben eingeschoben habe. Hier wurde nun durch Zusatz von 0,004 Adrenalin pro 100 ccm Tier 0,01 pro 100 ccm Tier so verstärkt, daß es, für sich selbst unwirksam (767), ebenso kräftig (772) wie die doppelte Dosis (766) wirkt. Das ist auch der Fall mit 0,015 Serum, das allein (894) injiziert keine Symptome gibt, aber sobald man 0,0035

[1]) Diese Zeitschr **110**, 155 1920.

Digitized by Google

Adrenalin pro 100 ccm Tier zusetzt, dieselben Symptome (895) wie die doppelte Dosis gibt.

Hierdurch scheint es mir erwiesen, daß das Adrenalin auch bei Seruminjektionen in die Carotis gehirnwärts, aber ganz besonders bei Seruminjektionen in die Carotis zentralwärts die Serumwirkung deutlich verstärkt, doch, wie schon oben gesagt, nicht so die Serumwirkung verändert, daß das gehirnwärts injizierte Serum durch Adrenalin dieselbe Wirkung bekommt, wie man sie durch Injektionen von Serum allein zentralwärts regelmäßig sieht.

Bis auf weiteres scheint es mir deswegen wahrscheinlich, daß das verschiedene Resultat von den intracarotalen Injektionen gehirnwärts und zentralwärts aus der verschiedenen Verteilung der Injektionsflüssigkeit durch die Gefäße beruht, wie ich es oben näher auseinandergesetzt habe.

Endlich möchte ich die hauptsächlichen Ergebnisse dieser Untersuchung zusammenfassen: 1. Durch Injektionen von hammelhämolytischem Serum von Kaninchen in die Carotis commun. zentralwärts bei Meerschweinchen bekommt man ein neues, bisher nicht beobachtetes Krankheitsbild, das durch Gleichgewichtsstörungen, Strabismus, bisweilen auch durch Exophthalmus, aber im allgemeinen nicht durch anaphylaktische Symptome charakterisiert ist.

2. Die so injizierten Tiere sterben nach viel kleineren Serumdosen als nach intravenösen Injektionen.

3. Dieser eigenartige Symptomenkomplex kommt wahrscheinlich dadurch zustande, daß bei intracarotalen Injektionen zentralwärts das Serum in erheblich größerer Menge durch die Art. verteb. dextra dem Kleinhirn zugeführt wird als bei Injektionen in Venen, Carotis gehirnwärts oder Aorta.

Digitized by Google

Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse.

II. Ultramikroskopische Untersuchungen an Stromata.

Von

Ernst Salén.

(Aus dem Institut für Kolloidforschung zu Frankfurt a. M.
Direktor: Prof. Dr. Bechhold.)

(Eingegangen am 8. Juli 1920.)

Über die Komponenten der Stromata von roten Blutkörperchen liegen sehr wechselnde Angaben vor. Die meisten Untersuchungen ergeben, daß dieselben aus Lipoiden (Cholesterin, Lecithin) und einer eiweißartigen Substanz bestehen; wir verweisen z. B. auf Hammarstens „Lehrbuch der physiologischen Chemie", der unter den Eiweißkörpern der Stromata auch ein Nucleoproteid erwähnt. Die Lipoide werden hauptsächlich in der äußeren Begrenzungsschicht angenommen. Durch die Untersuchungen von Overton und Meyer wurde die wichtige Rolle der Lipoide als Bestandteile der Blutkörperchenstromata festgestellt. Durch die Arbeiten anderer Autoren (s. u. a. Pascucci[1]), Neufeld u. Händel[2]) wird die Annahme der Gegenwart von Eiweiß in den Blutkörperchenhüllen sehr wahrscheinlich gemacht, wie es auch von Höber[3]) hervorgehoben wird.

Das Problem der Stromata wurde neuerdings von Bechhold und Kraus[4]) einer erneuten Prüfung unterzogen. Sie untersuchten ultramikroskopisch die Einwirkung verschiedener chemischer Agentien auf Blutkörperchen und Stromata. Die Versuche wurden mit gewaschenen Hammelblutkörperchen-Aufschwemmungen im Reagensglas ausgeführt. Bechhold und

[1]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **6**.
[2]) Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamt **28**, 572. 1908.
[3]) Physikal. Chemie d. Zellen u. Gewebe 1914, S. 426.
[4]) Diese Zeitschr. **109**, 226. 1920.

Digitized by Google

Kraus ziehen aus ihren Untersuchungen den Schluß, daß die Hülle eine eiweißartige Komponente besitzt, und daß diese wahrscheinlich eine netzförmige Struktur aufweist.

Die nachstehenden Untersuchungen, welche auf Vorschlag des Herrn Prof. Bechhold vorgenommen wurden, bezwecken die Frage unter Verwendung einer teilweise anderen Methodik zu klären. Einige Nachteile der bisher verwandten Methoden bestehen darin, daß teils, bei den durch chemische Analyse gemachten Untersuchungen, Beimischungen von nicht von den Erythrocytenstromata stammenden Eiweißstoffen, Reste von weißen Blutkörperchen und anderen geformten Elementen des Blutes nicht mit Sicherheit zu vermeiden sind; teils, daß es nicht möglich ist, die Veränderungen, welche in den Blutkörperchen bei ihrer Behandlung mit den verschiedenen chemischen Reagenzien vor sich gehen, kontinuierlich zu verfolgen. Um dies zu erreichen, erwies sich folgende Methodik als vorteilhaft: Auf gut gereinigte Objektträger wurden in bekannter Weise dünne gleichmäßige Aufstriche von Menschenblut gemacht. Nach 1—2 Stunden Eintrocknen bei Zimmertemperatur wurden die Präparate durch Einlegen in hypotonische (0,3 proz.) Kochsalzlösung[1]) vollständig hämolysiert und nachher mit destilliertem Wasser rasch abgespült[2]). Die Blutkörperchen, sowohl im ungefärbten als auch in dem nach Giemsa gefärbten Präparat, sind dann mikroskopisch nicht mehr sichtbar. Ultramikroskopisch sahen die Schatten im ungefärbten Präparat wie grauweiße Ringe von Blutkörperchengröße, mit ganz dunklem Innern aus. Im gefärbten Präparat traten die Schatten gegen den grünlichvioletten Hintergrund weniger deutlich hervor, während bei Anwesenheit von Hämoglobin, nach Färbung mit Giemsalösung, die ultramikroskopischen Bilder sehr verschärft zu werden pflegen.

[1]) Die Hämolysierung in destilliertem Wasser erwies sich als weniger zweckmäßig, weil nachher noch leuchtende Massen im Innern zu sehen waren.

[2]) Während der Hämolyse sieht man, daß sich vom Rand konzentrisch ein leuchtender Ring ablöst, sich zusammenzieht und schließlich ein leuchtendes Körperchen bildet. Am Schluß der Hämolyse ist es verschwunden. Gegen die Annahme, daß dies nur eine optische Erscheinung des quellenden und entquellenden Blutkörperchens ist, spricht die Tatsache, daß jedes Stadium der beschriebenen Erscheinung sich durch $FeCl_3$ fixieren läßt. Auch kann man im Anfangsstadium fadenförmige Verbindungen zwischen dem konzentrischen Ring und der Peripherie feststellen.

Digitized by Google

Auf diese Art hämolysierte Präparate wurden auf folgende verschiedenen Weisen behandelt:

1. mit Aceton (Cholesterinlösungsmittel) $^1/_2$ Stunde. Danach traten die zirkulären Schattenringe ultramikroskopisch bedeutend schwächer hervor, zeigten ein matteres Aussehen mit weniger scharfer Lichtbrechung. Außerdem war eine schwache Punktierung derselben zu sehen.

2. mit Saponinlösung (geht mit Lecithin und Cholesterin eine Verbindung ein) 1 : 1000 in 0,3 proz. Kochsalzlösung während 20 Minuten. Nach dieser Behandlung bekamen die Schattenringe ein Aussehen ungefähr wie die mit Aceton behandelten; nur war die Punktierung der Peripherie deutlicher wahrnehmbar, mit etwas größeren und kräftigeren lichtbrechenden Pünktchen[1]).

3. Wurde das saponinbehandelte Präparat (2) mit Aceton nachbehandelt, so traten folgende Veränderungen in dem ultramikroskopischen Bilde ein: die Punktierung verschwand und die ganze Peripherie erlosch bis auf ein ganz dünnes peripheres Gerüst, welches nur bei guter Einstellung bzw. Beleuchtung deutlich zu sehen war. Es erschien als schwachgraue, nicht punktierte, wie von dünnen Fasern zusammengesetztes, ringförmiges Gebilde, das sich nur ganz schwach gegen das dunkle Feld abhob.

4. Wurde das hämolysierte Präparat mit Alkohol behandelt, wodurch sowohl Lecithin als auch Cholesterin gelöst und Eiweiß gefällt wird, so blieb ein zart punktiertes, hauptsächlich an der Peripherie deutlich sichtbares, ringförmiges Gebilde zurück.

Um festzustellen, woraus diese, nach dem ultramikroskopischen Bild ganz minimalen Rückstände der Erythrocytenstromata bestehen, wurden verschiedene so behandelte Präparate teils mit Reagenzien, welche Eiweiß fällen, teils mit solchen, die Eiweiß lösen, behandelt.

Von Bechhold und Kraus ist festgestellt, daß $^1/_1$ n-Essigsäurelösung mit einem Gehalt von Ferrocyankalium in Konzen-

[1]) Wurde ein Präparat in destilliertem, statt in 0,3 proz. Kochsalzlösung hämolysiert und dann mit wässriger Saponinlösung behandelt, so bekamen die Schatten eine destruierte eckige Form, wobei die Ecken von hellcuchtenden Klümpchen gebildet waren. Durch Nachbehandlung mit Aceton konnten dieselben zum Teil zum Verschwinden gebracht und die vorherige rundliche Form wieder hergestellt werden.

Digitized by Google

trationen von $^1/_{10}$—$^1/_{200000}$ Lecithin nicht fällt[1]); dagegen werden eiweißartige Stoffe durch diese Lösung sofort gefällt. Von einigen Aufstrichpräparaten, welche nach vollzogener Hämolysierung mit Saponin, wie oben geschildert, behandelt waren, wurde jetzt eines in Ferrocyankalium-Essigsäurelösung von obenerwähnter Konzentration 15 Minuten gelegt. Die Peripherien der Schatten traten jetzt sehr deutlich hervor; der vorher schwachgraue Ton war mehr kreideweiß geworden, von geringer Lichtbrechung; der Durchmesser der Ringe schien breiter geworden zu sein mit schärferen inneren und äußeren Begrenzungslinien; die weiße Substanz wie feinkörnig punktiert (so wie gefällte Eiweißsubstanz ultramikroskopisch zu erscheinen pflegt). Im Inneren waren jetzt hier und da einige unscharf begrenzte, schwach hervortretende grauweiße Trübungen zu sehen.

Zuletzt wurden solche mit Saponin-Aceton behandelten hämolysierten Präparate der Einwirkung von Pepsin- und Trypsinlösungen ausgesetzt. Nach zweistündiger Aufbewahrung in Pepsinlösung und dann $2^1/_2$ Stunden in Trypsinlösung war das zarte Netz ultramikroskopisch verschwunden; nur einzelne schwach hervortretende Pünktchen waren noch zu sehen. Nach weiterer 12stündiger Trypsinbehandlung waren auch diese letzteren nicht mehr wahrnehmbar.

Das vorstehende gilt für die Hauptmenge der roten Blutkörperchen; quantitativ erhebliche Unterschiede waren nämlich festzustellen; hier und da war der gefällte Schattenrückstand nur ganz schwach sichtbar, in anderen Fällen wieder ungewöhnlich stark und grob hervortretend.

Mikroskopisch treten die vorher nicht wahrnehmbaren Schatten, nach der Fällung durch Ferrocyankalium in Essigsäurelösung, als sehr schwach erscheinende rundliche Gebilde hervor, ohne daß die Struktur hier näher zu beurteilen möglich wäre.

Aus obigen Versuchen ergibt sich folgendes:

Nach Auslösung der lipoiden Bestandteile der Stromata bleibt ein feiner, faser- oder netzförmiger Ring; dieser Rückstand wird von eiweißfällender Ferrocyankalium-Essigsäurelösung dahin verändert, daß die Ringe schärfer und deutlicher hervortreten; die die Ringe bildende Masse erscheint dann als eine weiße fein-

[1]) S. auch Porges und Neubauer, Diese Zeitschr. 7. 1908.

Digitized by Google

körnige Substanz. Weiter geht daraus hervor, daß der Rückstand durch Behandlung mit eiweißlösenden Fermenten (Pepsin, Trypsin) vollständig aufgelöst wird.

Der fragliche Rückstand besteht also aus einem in Wasser und physiologischer Kochsalzlösung unlöslichen Proteid oder Nucleoproteid. Aus den ultramikroskopischen Beobachtungen geht weiter hervor, daß dieser Rückstand als ein sehr dünnes netzförmiges Gebilde erscheint; daß er durch Behandlung mit Ferrocyankalium-Essigsäure oder Alkohol sich zu einer schärfer sichtbar werdenden, hellen, feinkörnigen Masse verdichtet. Es ist also anzunehmen, daß die proteide Substanz der Stromata vor der Behandlung mit Eiweißfällungsmitteln sich in gequollenem Zustand befindet, welcher keine sehr deutliche ultramikroskopische Wahrnehmung zuläßt und erst durch die Entquellung zur Erscheinung gebracht wird.

Damit klärt sich der Widerspruch zwischen mikroskopischer Beobachtung und chemischer Analyse: Die fibrinösen Bestandteile der Stromata, welche den roten Blutkörperchen ihre Gestalt geben, befinden sich in gequollenem Zustand, sie sind mikroskopisch nicht mehr wahrnehmbar und erweisen sich selbst ultramikroskopisch als ein nur wenig hervortretendes Gebilde, trotzdem sie auf Grund von Analysen Pascuccis $^2/_3$ der Stromata ausmachen sollen. Sie treten erst bei starker Verdichtung durch geeignete Entquellungsmittel deutlicher in die Erscheinung.

Digitized by Google

Die Mutarotation der Dextrose in Lösungen von sekundärem Natriumphosphat.

Von
Hans Murschhauser.

(Aus der akademischen Kinderklinik in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 16. Juli 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer vorausgehenden Mitteilung[1]) habe ich gezeigt, daß entgegen der Annahme von A. Levy[2]) und E. Trey[3]) der Mutarotationsverlauf von Dextrose auch in anorganischen, alkalisch reagierenden Medien meßbar verfolgt werden kann, wenn man einerseits den geeigneten Stoff wählt, und andererseits bei der Dosierung desselben mit der peinlichsten Sorgfalt vorgeht.

Als geeigneter Körper erwies sich das sehr rein darzustellende Natriumkarbonat. Die Konzentrationsbreite, innerhalb deren der Vorgang studiert wurde, erstreckte sich von $^1/_{10000}$ n- bis $^1/_{10}$ n-Natriumkarbonatlösung. Bei $^1/_{10000}$ n-Lösung war eine minimale Beschleunigung der Reaktion gegenüber destilliertem Wasser zu beobachten, bei $^1/_{10}$ n-Lösung war sie so groß, daß innerhalb der zum Lösen usw. benötigten Zeit von 5 Minuten der Prozeß bereits sein Ende erreicht hatte. Die Geschwindigkeitskonstante betrug im ersten Falle 7,11 gegenüber 6,73 beim destillierten Wasser. Die höchste Konzentration, die den Vorgang überhaupt meßbar zu verfolgen gestattete, war $^1/_{500}$ n-Natriumkarbonatlösung; die Geschwindigkeitskonstante betrug in diesem Falle 93,1.

Nach den Erfahrungen, die wir mit Natriumcarbonat gemacht hatten, war anzunehmen, daß auch andere alkalisch reagierende, anorganische Stoffe sich für den gleichen Zweck eigneten. In erster Linie kam hierfür das alkalisch reagierende sekundäre Natriumphosphat in Frage, dessen Einfluß auf die Mutarotation der Dextrose ich in Gemeinschaft mit Th. Köpps studiert habe.

Die zu den Versuchen verwendete Dextrose war ein „Purissimum wasserfrei"-Präparat von E. Merck, das Natriumphosphat ein reinstes Kahlbaumsches Präparat und für den vorliegenden

[1]) Diese Zeitschr. **106**, 23. 1920.
[2]) Zeitschr. f. physikal. Chemie **17**. 1895.
[3]) Zeitschr. f. physikal. Chemie **22**. 1897.

Digitized by Google

Zweck nochmals gelöst und unter 30° zur Krystallisation gebracht worden; es hatte somit die Zusammensetzung $Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$.

Zur Untersuchung des Drehungsrückganges bedienten wir uns eines Polarisationsapparates von Schmidt und Haensch mit Kreisgradeinteilung und Nonius. Die Angaben für die absolute Drehung in den folgenden Protokollen beziehen sich auf eine Rohrlänge von 189,4 mm. Zur allgemeinen Beurteilung sind die Werte auch auf die spezifische Drehung umgerechnet. Als Beleuchtungsquelle diente das Chlornatriumlicht.

Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: Je 5 g Dextrose wurden in einem geeichten 100 ccm-Kolben in 60 bis 70 ccm des Lösungsmittels (Wasser oder Natriumphosphatlösung) unter rotierender Bewegung desselben gelöst. Nach dem Auffüllen bis zur Marke wurde gut durchgemischt und die Lösung in das Rohr eingefüllt. Die erste Ablesung erfolgte regelmäßig 5 Minuten nach begonnenem Lösen, die weiteren anfangs in Zwischenräumen von 5 Minuten, die späteren in größeren Zeitabständen, je nach der Geschwindigkeit des Rotationsrückganges. Zur Erzielung eines Endwertes wurde nach 24 Stunden nochmals abgelesen. Im übrigen geschah die Bearbeitung der vorliegenden Frage unter Beachtung all der Vorsichtsmaßregeln, die sich aus früheren Versuchen als unerläßlich ergeben hatten.

Dies gilt namentlich hinsichtlich der Konstanz der Temperatur, der Abhaltung von Gasen aus der Laboratoriumsluft und der Verwendung von kohlensäurefreiem Wasser. Da die Kohlensäure mit Natriumphosphat nach der Formelgleichung

$$Na_2HPO_4 + CO_2 + H_2O = NaHCO_3 + NaH_2PO_4$$

reagiert, aus dem alkalisch reagierenden Natriumphosphat also saure Salze herstellt, die die Mutarotation beeinflussen würden, wurde sowohl zur Bereitung der Ausgangslösung von Natriumphosphat als zur Verdünnung derselben nur Wasser verwendet, das durch wiederholte Destillation über Säure und Baryt von alkalischen und sauren Beimengungen befreit worden war.

Bezüglich der übrigen Details der Arbeitsweise sei auf die frühere Veröffentlichung verwiesen.

In den folgenden Protokollen bedeutet t die Anzahl Minuten, die vom Beginn des Lösens bis zu der betreffenden Ablesung verstrichen sind, T die Temperatur der Lösung (20,4°), α die absolute Drehung im 189,4-mm-Rohr, α_D die daraus berechnete spezifische Drehung, ∞ den Endwert nach 24 Stunden.

Digitized by Google

Destilliertes Wasser.

5 g Dextrose zu 100 ccm destillierten Wassers.

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	10,25	108,2	—	—
10	20,4	9,85	104,0	34,4	6,88
15	20,4	9,48	100,1	68,9	6,88
20	20,4	9,15	96,62	102,1	6,81
25	20,4	8,90	93,98	129,1	6,46
30	20,35	8,60	90,82	163,6	6,54
40	20,4	8,10	85,53	228,8	6,54
50	20,4	7,65	80,78	296,9	6,60
60	20,4	7,30	77,08	358,4	6,52
70	20,4	6,95	73,39	430,1	6,62
80	20,4	6.68	70,54	494,9	6,60
90	20,4	6,40	67,58	574,0	6,75
100	20,4	6,20	65,47	641,0	6,75
110	20,4	6,00	63,36	720,1	6,86
120	20,3	5,85	61,78	790,7	6,87
140	20,4	5,65	59,66	907,2	6,72
160	20,4	5,50	58,04	1021,9	6,59
180	20,4	5,38	56,81	1140,4	6,52
200	20,4	5,28	55,97	1273,0	6,53
220	20,4	5,22	55,12	1377,7	6,41
240	20,35	5,15	54,38	1544,0	6,60
260	20,4	5,10	53,85	1720,2	6,74
280	20,3	5,08	53,64	1817,1	6,61
300	20,4	5,05	53,33	2021,1	6,85
320	20,4	5,02	53,01	—	—
340	20,4	5,00	52,80	—	—
∞		5,00	52,80	—	—
				Mittel:	6,67

$^n/_{1000}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	10,15	107,2	—	—
10	20,4	9,75	103,0	35,12	7,02
15	20,4	9,35	98,73	73,3	7,33
20	20,4	9,00	95,04	109,8	7,32
25	20,4	8,70	91,87	143,6	7,18
30	20,35	8,40	88,70	180,3	7,21
35	20,4	8,12	85,75	217,7	7,25
40	20,4	7,85	82,89	256,9	7,34
50	20,4	7,37	77,82	337,1	7,49
60	20,4	7,00	73,92	410,8	7,47
70	20,4	6,70	70,75	481,4	7,40
80	20,4	6,45	68,10	550,4	7,34
90	20,4	6,20	65,47	632,6	7,44
100	20,4	6,00	63,36	711,8	7,49
110	24,4	5,88	62,09	767,3	7,30
120	20,4	5,73	60,51	848,5	7,37
140	20,4	5,52	58,29	995,8	7,37
160	20,4	5,38	56,81	1132,0	7,30
180	20,4	5,30	55,96	1234,7	7,05
200	20,4	5,20	54,91	1410,8	7,23
220	20,45	5,12	54,07	1632,6	7,59
240	20,45	5,08	53,64	1808,7	7,69
260	20,45	5,00	52,80	—	—
∞		5,00	52,80	—	—
				Mittel:	7,34

Digitized by Google

$^n/_{200}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	10,00	105,6	—	—
10	20,4	9,42	99,47	53,6	10,70
15	20,4	8,98	94,83	99,09	9,91
20	20,45	8,55	90,49	148,7	9,92
25	20,4	8,15	86,06	200,7	10,00
30	20,4	7,85	82,89	244,1	9,77
35	20,4	7,50	79,20	301,0	10,00
40	20,4	7,30	77,08	337,2	9,64
45	20,4	7,05	74,45	382,7	9,68
55	20,4	6,65	70,22	481,5	9,63
65	20,4	6,30	66,52	585,0	9,75
75	20,4	6,02	63,57	696,0	9,86
85	20,6	5,85	61,78	769,6	9,62
100	20,45	5,60	59,13	920,8	9,69
120	20,4	5,35	56,49	1154,9	10,00
140	20,4	5,20	54,91	1397,9	10,30
160	20,4	5,12	53,85	1619,8	10,40
180	20,4	5,07	53,54	1853,9	10,50
200	20,4	5,02	53,33	—	—
∞		5,00	52,80	—	—
				Mittel:	9,96

$^n/_{200}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	9,90	104,5	—	—
10	20,4	9,30	98,20	56,12	11,20
15	20,4	8,80	92,92	109,2	10,90
20	20,4	8,30	87,65	169,6	11,30
25	20,4	7,92	83,63	213,2	11,10
30	20,45	7,60	80,25	271,4	10,80
35	20,4	7,27	76,77	329,1	11,00
40	20,4	6,98	73,71	387,1	11,10
45	20,4	6,70	70,75	451,6	11,30
55	20,35	6,33	66,84	554,8	11,10
65	20,4	6,00	63,36	673,4	11,20
75	20,4	5,80	61,25	765,2	10,90
85	20,4	5,60	59,13	881,7	11,00
100	20,4	5,35	56,43	1092,6	11,50
120	20,4	5,20	54,91	1296,7	11,30
140	20,4	5,10	53,85	1518,5	11,20
160	20,5	5,05	53,33	1694,5	11,06
180	20,5	5,00	52,80	1995,6	11,30
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	11,13

Digitized by Google

$^n/_{100}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	9,65	101,9	—	—
10	20,5	8,83	92,92	84,25	16,8
15	20,4	8,20	86,59	162,30	16,2
20	20,3	7,70	81,31	236,09	15,7
25	20,35	7,20	76,03	325,03	16,2
30	20,45	6,85	72,33	400,28	16,0
35	20,4	6,50	68,64	491,36	16,3
40	20,35	6,25	66,00	572,54	16,3
45	20,4	6,05	63,89	646,3	16,1
55	20,4	5,70	60,19	822,3	16,4
65	20,35	5,48	57,87	986,2	16,4
75	20,4	5,33	55,97	1148,9	16,4
85	20,4	5,22	55,12	1325,1	16,5
95	20,3	5,15	54,38	1491,3	16,5
105	20,4	5,10	53,85	1667,5	16,6
125	20,4	5,05	53,33	1968,5	16,4
∞		5,00	52,80	—	—
				Mittel:	16,3

$^n/_{80}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,35	9,50	100,3	—	—
10	20,55	8,65	91,3	89,8	17,9
15	20,5	7,90	83,42	188,2	18,8
20	20,4	7,30	77,08	286,9	19,1
25	20,4	6 85	72,33	379,2	18,9
30	20,4	6,50	68,64	467,7	18,7
35	20,4	6,20	65,47	564,1	18,7
40	20,4	5,95	62,83	658,0	18,8
45	20,4	5,70	60,19	783,0	19,5
50	20,4	5,60	59,12	845,1	18,8
55	20,4	5,45	57,55	959,0	19,2
60	20,4	5,35	56,50	1055,9	19,2
70	20,4	5,22	55,12	1226,7	18,8
80	20,4	5,15	54,38	1357,0	18,1
90	20,4	5,07	53,85	1578,8	18,6
110	20,4	5,05	53,33	1658,0	17,5
125	20,4	5,00	52,80	1959,0	18,7
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	18,7

Digitized by Google

$^n/_{60}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	9,40	99,26	—	—
10	20,4	8,50	89,96	98,1	19,6
15	20,35	7,65	80,78	217,0	21,7
20	20,35	7,10	74,97	315,9	21,0
25	20,35	6,70	70,75	405,3	20,2
30	20,4	6,30	66,53	518,0	20,7
35	20,4	6,00	63,36	627,2	20,9
40	20,4	5,75	60,72	745,3	21,2
45	20,4	5,55	58,61	835,5	20,9
50	20,3	5,43	56,70	967,1	21,4
55	20,45	5,32	56,18	1080,2	21,6
60	20,4	5,25	55,44	1171,2	21,3
70	20,4	5,15	54,38	1347,3	20,7
80	20,4	5,10	53,85	1472,3	19,6
85	20,4	5,02	53,33	1803,3	20,0
90	20,4	5,00	52,80	1949,4	20,4
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	20,7

$^n/_{40}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	9,20	97,15	—	—
10	20,4	8,15	86,06	123,2	24,6
15	20,4	7,30	77,09	257,3	25,7
20	20,4	6,80	71,81	361,2	24,1
25	20,4	6,37	67,58	476,1	23,8
30	20,5	6,00	63,36	607,2	24,3
35	20,4	5,75	60,72	725,3	24,1
40	20,4	5,50	58,08	888,0	25,3
45	40,4	5,35	56,49	1026,5	25,6
50	20,4	5,25	55,44	1151,3	25,6
55	20,35	5,20	54,91	1230,9	25,6
65	20,4	5,10	53,85	1452,3	24,2
75	20,4	5,02	53,01	1783,3	25,5
80	20,4	5,00	52,80	1929,4	25,7
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	25,0

$^n/_{30}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	8,90	93,98	—	—
10	20,4	7,72	81,31	154,1	30,8
15	20,4	6,85	72,33	317,8	31,8
20	20,4	6,30	66,53	466,2	31,1
25	20,4	5,90	62,35	618,9	30,9
30	20,4	5,65	59,66	818,5	31,2
35	20,4	5,40	57,02	943,3	31,4
40	20,4	5,25	55,44	1119,5	31,9
45	20,4	5,15	54,40	1295,6	32,4
∞	—	4,95	52,27	—	—
				Mittel:	31,4

Digitized by Google

$^n/_{20}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	8,55	90,29	—	—
10	20,4	7,25	76,56	194,5	38,9
15	20,35	6,40	67,58	394,9	39,5
20	20,35	5,90	62,30	578,6	38,6
25	20,35	5,55	58,61	778,1	38,9
30	20,35	5,32	55,97	988,7	39,5
35	20,35	5,20	54,91	1168,4	38,9
40	20,4	5,10	53,85	1380,2	39,5
50	20,4	5,00	52,80	—	—
55	20,4	5,00	52,80	—	—
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	39,1

$^n/_{10}$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	7,70	81,31	—	—
10	20,4	6,33	67,05	307,5	61,5
15	20,4	5,60	59,13	653,2	65,3
20	20,35	5,30	55,96	954,0	63,6
25	20,4	5,15	54,38	1255,3	62,7
30	20,35	5,07	58,33	15 86,3	63,4
35	20,3	5,00	52,80	—	—
40	20,3	5,00	52,80	—	—
45	20,4	5,00	52,80	—	—
∞		5,00	52,80	—	—
				Mittel:	63,3

$^n/_7$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	7,30	77,08	—	—
10	20,4	5,95	62,83	384,0	76,9
15	20,4	5,30	55,97	827,0	82,7
20	20,4	5,10	53,85	1195,0	79,7
25	20,5	5,00	52,80	1672,0	83,6
35	20,4	4,95	52,27	—	—
∞		4,95	52,27	—	—
				Mittel:	80,7

$^n/_4$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D	$\log b - \log(b-x)$	C
5	20,4	6,50	68,64	—	—
10	20,4	5,35	56,49	588,27	117,6
15	20,4	5,05	53,33	1190,33	119,0
20	20,4	5,00	52,80	1491,36	—
∞	—	4,95	52,27	—	—
				Mittel:	118,3

$^n/_2$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D
5	20,4	5,65	59.66
10	20,4	5,00	52,80
15	20,4	4,95	52,27
20	20,4	4,95	52,27
∞	—	4,95	52,27

Digitized by Google

$^n/_1$-$Na_2HPO_4 \cdot 12\,H_2O$

t'	T	α	α_D
5	20,4	5,00	52,80
10	20,5	4,90	51,74
15	20,4	4,90	51,74
∞	—	4,90	51,74

Nach den analytischen Befunden übt das Natriumphosphat einen ähnlichen Einfluß auf den Drehungsrückgang frisch bereiteter Dextroselösungen aus wie das Natriumcarbonat. Seine Wirkung besteht darin, daß es die Mutarotation rein wässerigen Lösungen gegenüber beschleunigt, und zwar um so mehr, je höher der Salzgehalt der Lösung ansteigt. Bei wässeriger Dextroselösung werden 5, 10 und 20 Minuten nach begonnenem Lösen Drehungen von 108,2°, 104,0 bzw. 96,62° erzielt. Enthält die Lösung dagegen beispielsweise $^n/_{600}$-Äquivalent Natriumphosphat, so geht die Rotation nach denselben Zeiten auf 105,6, 99,5 bzw. 90,5° und bei einem Gehalt von $^n/_{60}$-Äquivalent des Salzes auf 99,6, 89,96 bzw. 74,97° zurück. $^1/_{1000}$ Äquivalent Na_2HPO_4 beschleunigt den Vorgang gegenüber der wässerigen Lösung so geringfügig, daß diese Menge die unterste, experimentell zu ermittelnde Grenze für die Salzkonzentration darstellen dürfte. Als höchste Grenze wurde diejenige Konzentration aufgesucht, bei der die Mutarotation innerhalb der zum Lösen usw. benötigten Zeit von 5 Minuten ihren Abschluß gefunden hatte. Diese Konzentration ist $^1/_1$-n-Na_2HPO_4.

Recht übersichtlich läßt sich der Mutarotationsverlauf der wässerigen und natriumphosphathaltigen Dextroselösungen durch eine graphische Wiedergabe zeigen.

Trägt man die Werte für den Reaktionsverlauf in Millimeterquadratnetzpapier ein mit der Zeit als Abszisse, den Zahlen für die Drehung als Ordinaten, so präsentiert sich die Mutarotation als ein Prozeß, der in Kurven abläuft und anscheinend völlig gesetzmäßig durch Natriumphosphat beeinflußt wird. Diese Kurven verlaufen um so steiler und werden um so kürzer, je mehr die Salzkonzentration erhöht wird. Wenn der Einfluß des Natriumphosphats in einer mit der Konzentration des Salzes zunehmenden Beschleunigung der Mutarotation besteht, so müssen die Kurven um so tiefer ansetzen, je höher der Salzgehalt der Lösung ist, und schließlich muß bei einer bestimmten Konzentration die erste Ablesung 5 Minuten nach begonnenem Lösen mit der Abszisse zusammen fallen.

Um nun einerseits die Gesetzmäßigkeit des Vorgangs zu demonstrieren, und um andererseits den Einfluß der Konzentration des Natriumphosphats

Digitized by Google

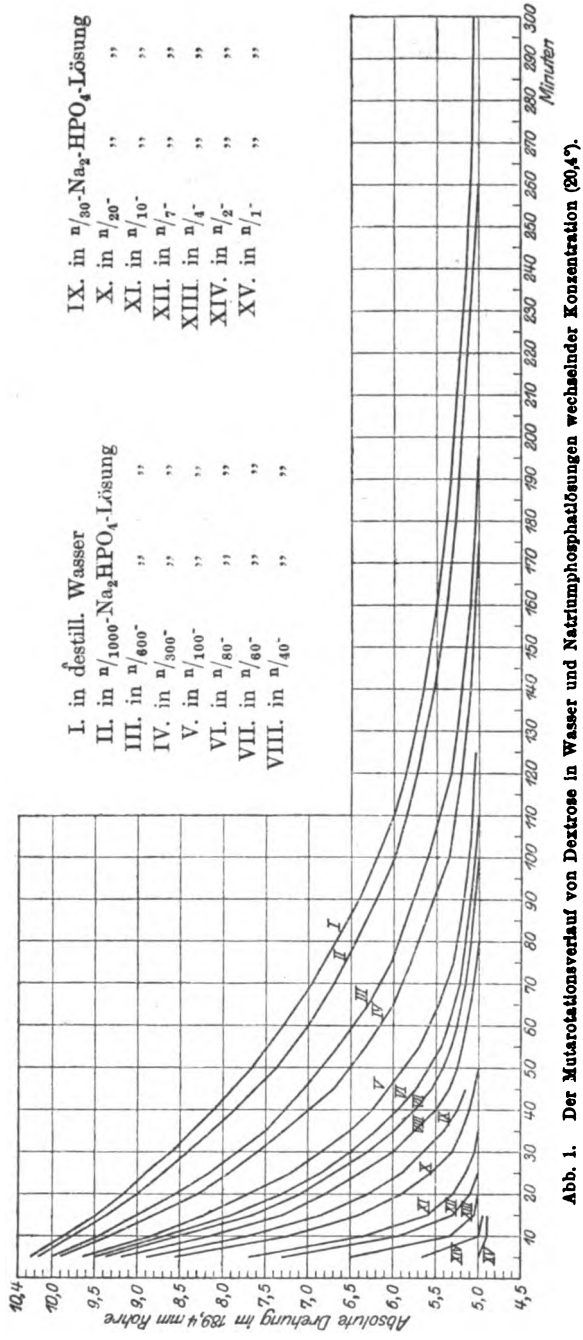

I. in destill. Wasser
II. in n/1000-Na2HPO4-Lösung
III. in n/600- „ „
IV. in n/300- „ „
V. in n/100- „ „
VI. in n/80- „ „
VII. in n/60- „ „
VIII. in n/40- „ „
IX. in n/30-Na2-HPO4-Lösung
X. in n/20- „ „
XI. in n/10- „ „
XII. in n/7- „ „
XIII. in n/4- „ „
XIV. in n/2- „ „
XV. in n/1- „ „
Absolute Drehung in 189,4 mm Rohre
Minuten

Abb. 1. Der Mutarotationsverlauf von Dextrose in Wasser und Natriumphosphatlösungen wechselnder Konzentration (20,4°).

Digitized by Google

auf die Geschwindigkeit der Mutarotation der Dextrose zahlenmäßig darzustellen, logarithmieren wir das Winkelverhältnis zwischen dem gesamten durchlaufenen Winkel und der Differenz zwischen diesem und dem zur Zeit durchlaufenen Winkel x nach der von Wilhelmy für Reaktionen erster Ordnung aufgestellten Formel:

$$\log \frac{1}{1 - \frac{x}{b}} = c \cdot t$$

und lösen die Gleichung nunmehr nach c auf. Wir erhalten dann die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion bei den verschiedenen Salzkonzentrationen; diese nehmen die Vertikalreihe C in den vorstehenden Protokollen ein.

Die Übereinstimmung der einzelnen Glieder innerhalb einer bestimmten Konzentration deutet daraufhin, daß die Mutarotation der Dextrose auch in Lösungen von sekundärem Natriumphosphat nach dem Gesetz für Reaktionen erster Ordnung verläuft. Ein Vergleich der Mittelwerte für die Geschwindigkeitskonstanten bei den verschiedenen Lösungen zeigt uns andererseits den Einfluß der Salzkonzentration auf den Grad der Beschleunigung.

Zur raschen Orientierung sind in der folgenden Tabelle die Konzentrationsverhältnisse von Natriumphosphat mit den Geschwindigkeitskonstanten und der zu diesen gehörigen Anzahl Minuten zusammengestellt, die vom Beginn des Lösens bis zur Erreichung eines gemeinschaftlichen Drehungswertes (5,1°) verstrichen sind.

Na_2HPO_4-Lösung.

	H_2O	$^n/_{1000}$	$^n/_{600}$	$^n/_{300}$	$^n/_{100}$	$^n/_{80}$	$^n/_{60}$	$^n/_{40}$	$^n/_{30}$	$^n/_{20}$	$^n/_{10}$	$^n/_7$	$^n/_4$
c =	6,67	7,34	9,96	11,13	16,3	18,7	20,7	25,0	31,4	39,1	63,3	80,7	118,3
Min. bis z. Erreichg. der Drehung 5,1°	260	230	170	140	105	87	80	65	50	40	28	20	14

Die Geschwindigkeitskonstante steigt, die Reaktionsdauer fällt mit der Erhöhung des Salzgehaltes. Um aufzufinden, ob irgendeine gesetzmäßige Beziehung zwischen der Salzkonzentration und der Geschwindigkeitskonstante des Rotationsrückganges besteht, tragen wir die Werte für die letztere als Ordinaten in ein Millimeterquadratnetzpapier ein und wählen als Abscisse die Salzkonzentration. Der Theorie nach erwarten wir eine sehr schwach parabolisch gekrümmte Kurve; aus der graphischen Darstellung entnehmen wir, daß die Geschwindigkeitskon-

Digitized by Google

stante praktisch geradlinig mit der Konzentration der Lösung an Natriumphosphat ansteigt.

Wir haben beim Natriumcarbonat bereits die Tatsache festgestellt, daß die Geschwindigkeitskonstante des Mutarotationsverlaufs mit der Konzentration des Salzes annähernd geradlinig ansteigt. Um die Wirkung dieser beiden Salze auf die Änderung der Geschwindigkeitskonstante quantitativ miteinander vergleichen zu können, excerpieren wir aus beiden Untersuchungsreihen diejenigen Konzentrationen, bei denen sich die Konstanten annähernd decken.

Na_2CO_3	$^n/_{7000}$	$^n/_{6000}$	$^n/_{2000}$	$^n/_{1000}$
$C =$	7,32	9,32	24,4	50,5
Na_2HPO_4	$^n/_{1000}$	$^n/_{600}$	$^n/_{40}$	$^n/_{13}$ (konstruiert)
$C =$	7,34	9,96	25,0	51

Die Geschwindigkeitskonstanten der Mutarotation sind demnach für $^1/_{1000}$ n-Na_2HPO_4 und $^1/_{7000}$ n-Na_2CO_3, ferner für $^1/_{600}$ n-Na_2HPO_4 und $^1/_{6000}$ n-Na_2CO_3, für $^1/_{40}$ n-Na_2HPO_4 und $^1/_{2000}$ n-Na_2CO_3 und schließlich für $^1/_{13}$ n-Na_2HPO_4 und $^1/_{1000}$ n-Na_2CO_3 annähernd dieselben.

Aus einem Vergleich der Konzentrationsverhältnisse der Lösungen beider Salze mit gleichem *C*-Wert geht hervor, daß die Dextrose gegen Natriumcarbonat viel empfindlicher ist als gegen Natriumphosphat. Des ferneren erhellt daraus die Tatsache, daß der Anstieg der Geschwindigkeitskonstante mit der Konzentration des Salzes beim Natriumcarbonat viel stärker ist als beim Natriumphosphat.

Bei dem gemeinschaftlichen *C* von 7,32 ist das Äquivalenzverhältnis von $Na_2CO_3 : Na_2HPO_4 = 1 : 7$; bei einem *C* von 9,3 bzw. 9,96 ist das Äquivalenzverhältnis von $Na_2CO_3 : Na_2HPO_4 = 1 : 10$; bei einem *C* von 24,4 bzw. 25,0 ist das Äquivalenzverhältnis von $Na_2CO_3 : Na_2HPO_4$ = ca. 1 : 50; bei einem *C* von 50,5 bzw. 51 ist das Äquivalenzverhältnis von $Na_2CO_3 : Na_2HPO_4$ = ca. 1 : 77.

Die Gerade, die wir, aus den Geschwindigkeitskonstanten der Mutarotation der Dextrose unter dem Einfluß steigender Mengen von Natriumcarbonat konstruieren, steigt demnach viel steiler an, als dies beim Natriumphosphat der Fall ist.

Beide Gerade bilden nun mit der Horizontalen Winkel verschiedener Größe. Diese Winkel dürften, da die Änderung der

Digitized by Google

Mutarotation in alkalisch reagierenden Medien auf mehr oder minder starke hydrolytische Spaltung der alkalisch reagierenden Salze zurückzuführen ist, ein Maß für den Verlauf der hydrolytischen Dissoziation von Salzen unter wechselnden Konzentrationsverhältnissen darstellen.

Die Dissoziationsverhältnisse zweier verschiedener Salze in wechselnden Konzentrationen würden sich demnach unter Zugrundelegung eines einheitlichen Maßstabes durch die Beziehungen ihrer Winkelgrößen miteinander vergleichen lassen.

In dem vorliegenden Falle ist dies versuchsweise geschehen:

Die Geschwindigkeitskonstanten der Mutarotation sind als Ordinaten in ein Millimeterquadratnetzpapier eingetragen worden, so zwar, daß jedes Millimeter zwei Einheiten entspricht; die Abscisse repräsentiert die Salzkonzentration: jeder Millimeter entsprechend 2 mg Salz. Wir erhalten alsdann für das Natriumcarbonat einen Winkel von 42°8′, für das Natriumphosphat einen solchen von 0°53′ [1]).

Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, ob die aufgefundenen Beziehungen zwischen der Konzentration des Katalysators und den Geschwindigkeitskonstanten der Mutarotation sich als Grundlage für eine vergleichende Darstellung des Hydrolysegrades von alkalisch reagierenden Salzen in wechselnden Konzentrationen verwerten lassen. Zur Entscheidung dieser Frage müssen die beschriebenen Versuche erweitert und durch Leitfähigkeitsbestimmungen ergänzt werden.

---

[1]) Die Winkelberechnung für den Hydrolyseverlauf erfolgte aus den Katheten. Es ergab sich für Na_2CO_3:

$$\begin{aligned} \log 17{,}1 &= 1{,}23300 \\ \log 18{,}9 &= 1{,}27646 \\ \log \operatorname{tg} \beta &= 9{,}95654^{-10} \end{aligned}$$

der Winkel beträgt demnach $\beta = 42°8'$.

Da nun $\cos \beta_1$ 60 mal so groß als $\cos \beta$, so ergibt sich für Na_2HPO_4:

$$\begin{aligned} \log \cos \beta &= 0{,}87016^{-1} \\ \log 60 &= 1{,}77815 \\ \log \cos \beta_1 &= 1{,}64831 \end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned} \log \sin \beta &= 0{,}82663^{-1} \\ \log \cos \beta_1 &= 1{,}64831 \\ \log \operatorname{tg} \beta_1 &= 0{,}17832^{-2} \end{aligned}$$

Der Winkel für Na_2HPO_4 beträgt 0°52.

Digitized by Google

Die dritte Vergärungsform des Zuckers als allgemeine Folge der Dismutationswirkung anorganischer und organischer Alkalisatoren.

Von
Carl Neuberg und Werner Ursum.

(Aus der chemischen Abteilung des Kaiser-Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Berlin-Dahlem.)

Allgemeine Verhältnisse.

Bis vor kurzem war nur eine Art der Spaltung von Zucker durch Hefe bekannt, die gewöhnliche alkoholische Gärung.

Sie ist in ihrem quantitativen Verlaufe schon 1815 von Gay-Lussac im wesentlichen richtig erkannt. Im Jahre 1828 beseitigten Dumas und Boullay einen kleinen Fehler, welcher der Gay-Lussacschen Formulierung noch anhaftete; er betraf die Zusammensetzung des Rohrzuckers, die Gay-Lassac und Thénard irrigerweise durch die Formel $C_{12}H_{24}O_{12}$ ausgedrückt hatten, während ihm tatsächlich die um 1 Molekül Wasser ärmere, $C_{12}H_{22}O_{11}$, zukommt. Bezieht man die alkoholische Zuckerspaltung auf die Monosaccharide, aus denen sich der Rohrzucker aufbaut, so lautet die richtige Gleichung für den gewöhnlichen Gärakt: $C_6H_{12}O_6 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5 \cdot OH$.

Die übliche Formulierung der alkoholischen Zuckerspaltung sagt nun nicht das geringste aus über die Vorgänge, die sich bei diesem eigentümlichen Prozeß abspielen.

Um Einblicke in die ersichtlicherweise erforderlichen Transformationen zu gewinnen, die am Zuckermolekül vor seiner Auflösung in die Gärungsendprodukte einsetzen müssen, haben Neuberg und Färber[1]) zuerst Methoden angegeben, willkürlich Abweichungen im Gärungsverlauf hervorzurufen und so Anhaltspunkte für die zu erwartenden Zwischenstufen zu erzielen. Auf Grund theoretischer Überlegungen und rein chemischer Erfahrungen bedienten sie sich der Zusätze verschiedener schwach alkalisch reagierender Substanzen. Denn von den Alkalien ist bekannt, daß sie in vitro eine Depolymerisation der 6-Kohlenstoffkette herbeiführen, indem je nach den Bedingungen Methylglyoxal oder Milchsäure erhalten werden

[1]) C. Neuberg und E. Färber, Diese Zeitschr. 78, 238. 1916.

Digitized by Google

können; umgekehrt bewirken ja auch Basen die Aldolkondensation von Zuckern der 3-Kohlenstoffreihe zu Hexose.

Als Folge des Zusatzes alkalisch reagierender Salze hatten Neuberg und Färber sehr wesentliche Veränderungen unter den Vergärungsprodukten des Zuckers festgestellt. Trotz völliger Aufteilung des Kohlenhydrats blieb beispielsweise die Alkoholausbeute erheblich hinter der Norm zurück, die rund die Hälfte der angewandten Zuckermenge, theoretisch 51,11%, beträgt; auch die Kohlensäurebildung war entsprechend vermindert. An Stelle der typischen Gärungserzeugnisse traten in vermehrtem Maße andere Substanzen auf, die für gewöhnlich nur spärlich vorhanden sind, nämlich Acetaldehyd und Glycerin.

Diese Ergebnisse waren im Jahre 1916 beschrieben. Die gesteigerte Glycerinerzeugung auf dem Gärungswege unter Benutzung ganz ebensolcher Alkalisatoren, wie Neuberg und Färber (l. c.) angeführt hatten, ist nach einer 3 Jahre später erschienenen Mitteilung[1]) dann auch in Amerika vorgenommen worden. Über die von Neuberg und seinen Mitarbeitern erkannten theoretischen Zusammenhänge enthält das betreffende Referat des Chem. Centralbl.[1]) keinerlei Angabe.

Die genauere Verfolgung jener von Neuberg und Färber gemachten Feststellungen ergab, daß man zwei Gruppen von alkalisch reagierenden Salzen unterscheiden muß. Zwar zeigte sich, daß alle einsetzenden Veränderungen darauf beruhen, daß die zugefügten Alkalisatoren an der Stufe des Acetaldehyds angreifen, der gemäß der von Neuberg im Jahre 1913 aufgestellten sog. „Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung" ein Durchgangsglied bildet. Aber dieser intermediär auftretende Acetaldehyd kann sich gegen die angewendeten Mineralstoffe durchaus verschieden verhalten.

C. Neuberg und E. Reinfurth[2]) haben ermittelt, daß die alkalisch reagierenden sekundären schwefligsauren Salze den Acetaldehyd einfach abfangen und ihn in Form des wohlbekannten Acetaldehyd-Sulfit-Komplexes festlegen. Daher hat dieses Verfahren der Gärungsabänderung, das sich der Sulfite zur Aldehydfixierung bedient, den Namen „Abfangmethode" erhalten.

Anders geartet ist die Wirkungsweise der übrigen alkalisch

[1]) Ch. C. 1919. IV. 460.

[2]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 365 und 92, 234. 1918.

Digitized by Google

reagierenden Verbindungen. Diese sind nicht mit einem solchen spezifischen Bindungsvermögens für den Aldehyd ausgestattet, wie die schwefligsauren Salze, das auf einer rein chemischen Attraktion beruht; sie greifen vielmehr in das biochemische Getriebe, in den Reigen der Enzyme, während des Gäraktes ein. Ihre Einwirkung spielt sich ebenfalls am Acetaldehyd ab und kommt folgendermaßen zu stande:

Im Jahre 1913 hatten Neuberg und Kerb[1]) dargetan, daß Acetaldehyd in Berührung mit Hefe verschwinden und in Essigsäure sowie Äthylalkohol übergehen kann. Zu dem gleichen Ergebnis kam in dem darauffolgenden Jahre auch S. Kostytschew. Das heißt: Die Hefe ist imstande, Acetaldehyd gemäß der Cannizzaroschen Reaktion sehr glatt umzulagern, ein Verhalten, das um so bemerkenswerter ist, als die von Neuberg und Färber verwendeten schwachen Alkalisatoren bekanntlich an sich diese Reaktion nicht herbeiführen, indem sie unter den obwaltenden Verhältnissen den Acetaldehyd zumeist unverändert lassen oder höchstens zu Aldol, Crotonaldehyd bzw. Aldehydharz kondensieren.[2]) Diese Disproportionierung des Acetaldehyds durch die Hefe ist demzufolge ein enzymatischer Prozeß und gerade ihn katalysieren die zugefügten Mineralstoffe. Eine solche Mutasefunktion ist uns eine bei verschiedenen Zellarten geläufige Erscheinung. Daß sich auch diese ihre Wirkung auf den bei der Gärung intermediär entstehenden, jeweils nur in geringer Konzentration vorhandenen Acetaldehyd erstreckt, haben sodann Neuberg und Hirsch[3]) gezeigt und das darauf beruhende Verfahren zum Eingriff in die Zuckerspaltung durch Hefe als „Dismutationsmethode" bezeichnet.

Sowohl bei dem Abfangsverfahren als bei der Dismutationsmethode wird ersichtlicherweise der Acetaldehyd in Mitleidenschaft gezogen: im ersten Fall wird er an schwefligsaure Salze als ein Komplex gekettet, im letzten Falle wird er der Dismutation unterworfen. War also die „Acetaldehyd-Brenztraubensäure-Theorie der Gärung" richtig, laut welcher beim Zuckerabbau die Stufe des Acetaldehyds durchlaufen wird, so mußte

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. **58**, 158. 1913.

[2]) Die Aldolisierung verläuft nach A. Lieben (M. **22**, 289, 1901) soviel schneller als die Cannizzarierung, daß letztere selbst mit starker KOH nur zu 5% eintritt. — Anm. b. d. Korrekt. Denselben Befund hat jüngst H. Hammarsten (A. **420**, 264, 1920) erhoben.

[3]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **96**, 175 und **100**, 304. 1919; dort auch die übrige hierher gehörige Literatur.

Digitized by Google

jede wie auch geartete Eliminierung dieses Produktes noch andere Folgen nach sich ziehen. Der Acetaldehyd stellt nämlich im Vergleich zu dem um 2 Wasserstoffatome reicheren Äthylalkohol ein Oxydationserzeugnis dar. Wenn ein solches irgendwie aus der Reihe der Umwandlungsprozesse beim Gärakt herausgeführt wird, so muß eine entsprechende Reduktionsleistung nachweisbar sein. Drei Möglichkeiten waren vorhanden: Entweder konnte der Wasserstoff, der infolge Fixierung des Durchgangsgliedes Acetaldehyd verfügbar wird, gasförmig entweichen oder er konnte gegebenenfalls eine Desoxydation der zugefügten Alkalisatoren zuwege bringen oder schließlich sich irgendwie am Zuckermolekül oder seinen Spaltungsprodukten betätigen.

Die letzte der drei Wirkungsweisen greift Platz: Der bewegliche Wasserstoff erfaßt einen Zuckeranteil und reduziert ihn zu Glycerin. Bei dem vollkommenen Parallelismus, der zwischen den Oxydationen und Reduktionen am Zuckermolekül abwalten muß, stehen auch Acetaldehyd sowie seine Dismutationsprodukte in absoluter Korrelation zum Glycerin. Die genauen Analysen haben ergeben, daß beim „Abfangverfahren" Acetaldehyd und Glycerin stets in molekularem Verhältnis auftreten und daß bei der „Dismutationsmethode", bei der Vergärung in Gegenwart einfacher alkalischer Salze, auf je 1 Molekül der beiden Disproportionierungsgebilde Essigsäure und Alkohol 2 Mol. Glycerin vorhanden sind. Dieses Verhältnis herrscht deshalb, weil ja ursprünglich 1 Molekül Acetaldehyd und 1 Molekül Glycerin äquivalent sind und dann erst 2 Moleküle Acetaldehyd, denen 2 Mol. Glycerin entsprechen, die Cannizzarierung zu Essigsäure und Äthylalkohol erfahren.

Es ist nun leicht verständlich, daß diese experimentell erzeugten Eingriffe in den Verlauf der alkoholischen Gärung keine quantitative Abartung nach der Seite des ungewöhnlichen Verlaufs hin ermöglichen. Abgesehen von dem bekannten zähen Bestreben aller Organismen, ihren gewohnten Stoffwechsel soweit wie irgend möglich aufrecht zu erhalten, sind biochemische wie rein chemische Gründe für jenes Unvermögen mitbestimmend. Es ist einmal wegen der Toxizität der Zusätze nicht möglich, so viel von den Alkalisatoren mit den Hefezellen oder Hefefermenten in Berührung zu bringen, wie zu einer vollständigen Herbeiführung der abgeänderten Gärungsform notwendig wäre. Dann sind aber auch rein chemische Ursachen maßgebend. So setzt z. B. bei dem Abfangsverfahren die Dissoziation des Aldehyd-Sulfit-Komplexes der Bindung des Acetaldehyds eine Grenze. Bei den anderen Alkalisatoren muß man u. a. mit der fehlenden oder geringen Kraft der anorganischen Salze rechnen, die Hüllen der Hefezellen zu durchdringen, oder wenn man in zellfreien Systemen arbeitet, die erheblichen, zum Teil wohl irreversiblen Zustandsänderungen in Betracht ziehen, die von der hohen Konzentration an Mineralstoffen ausgelöst werden.

So kommt es, daß die beiden neuen Vergärungsarten nicht unter gänzlicher Aufhebung des gewöhnlichen Zuckerabbaus herbeigeführt werden können. Immerhin ließen sie sich in beträchtlichem Umfange verwirklichen, so die Acetaldehyd-Glycerin-Spaltung des Zuckers bis zu etwa 75% der theoretischen Möglichkeit und der Zerfall in Essigsäure,

Digitized by Google

Alkohol nebst Glycerin in früheren Versuchen bis zu rund 38% (vgl. hierzu S. 199 und 206).

Unter Berücksichtigung sämtlicher Gärungsprodukte ist es möglich gewesen, genaue Bilanzen[1]) für die neuen Weisen des Zuckerabbaus aufzustellen, und man muß nun drei Arten desselben unterscheiden:

a) Die erste Vergärungsform. Als diese kann man die ideale Formulierung bezeichnen: $C_6H_{12}O_6 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5 \cdot OH$, die auf Gay-Lussac (1815) zurückgeht.

b) Die zweite Vergärungsform. Sie wird, wenn man in der Schreibweise von einer Bindung der reagierenden Stoffe an die Sulfite absieht, durch folgende Gleichung ausgedrückt: $C_6H_{12}O_6 = CH_3 \cdot CHO + CO_2 + C_3H_8O_3$ (Neuberg und Reinfurth, 1918).

c) Die dritte Vergärungsform. Sie nimmt infolge Dismutation des — wie bei der zweiten Vergärungsform — intermediär gebildeten Acetaldehyds die Fassung an: $2\,C_6H_{12}O_6 + H_2O = CH_3 \cdot COOH + C_2H_5 \cdot OH + 2\,CO_2 + 2\,C_3H_8O_3$ (Neuberg und Hirsch, 1919).

So wenig übrigens wie die zweite und dritte Vergärungsart frei von der ersten verwirklicht werden können, ebenso wenig spielt sich erstere in der Natur ohne Ablauf der zweiten und dritten ab. Zeugnis dafür gibt das Auftreten kleiner Mengen Acetaldehyd, Essigsäure und Glycerin bei jedem Gärungsvorgang ab; und insbesondere für das Glycerin haben Neuberg und Hirsch[2]) dargelegt, daß es seine Entstehung einer physiologischen Abfangung der korrelativen Oxydationsstufe — Acetaldehyd bzw. Brenztraubensäure — verdanken dürfte, indem diese Körper für alle möglichen Stoffwechselvorgänge intern gebraucht werden. Es ist ferner eine dem Zymochemiker bekannte Tatsache, daß je weniger H-Ionen eine zur Vergärung angesetzte Maische aufweist, um so mehr Säure von der Hefe auf Kosten des Zuckers gebildet wird. Dabei handelt es sich im wesentlichen um Essigsäure, und wir sehen somit, daß die Erreger der alkoholischen Gärung, scheinbar ohne besonderen Anlaß, zum Teil nach der dritten Vergärungsform arbeiten. In Wirklichkeit liegen die Verhältnisse so, daß für den geordneten Eintritt der typischen Zymasetätigkeit eine gewisse Acidität erforderlich ist, und zwar ist die günstigste H-Ionenkonzentration nach den neuesten Erfahrungen $p_H = 2{,}7$ bis 3,8. So sucht sich die Hefe selbst eine optimale Umgebung zu schaffen. Erst wenn die Menge der zugefügten Alkalisatoren so groß wird, daß die normalen Regulationskräfte zur Über-

[1]) C. Neuberg, J. Hirsch und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **105**, 307. 1920.

[2]) C. Neuberg und J. Hirsch, diese Zeitschr. **100**, 304. 1919.

Digitized by Google

windung der ungewöhnlichen OH-Ionenmenge nicht mehr ausreichen, tritt in vermehrtem Maße die dritte Vergärungsform zutage.

Bisher liegen quantitative Untersuchungen über den Umfang, in dem diese dritte Vergärungsform ausgelöst werden kann, nur für die Carbonate und Phosphate der Alkalien vor sowie für die beiden Basen Magnesia und Zinkhydroxyd. Um festzustellen, ob ganz allgemein Körper mit irgend einer basischen Funktion Erreger der dritten Vergärungsform sein können, haben wir eine größere Reihe derartiger „alkalischer" Substanzen geprüft, und zwar das Ammoniumbicarbonat, Kaliumpyrophosphat, Natriumsulfhydrat, Natriumsulfoantimoniat, Natriumarsenat, Natriumsilicat, oleïnsaures Natrium, benzoesaures Natrium, d,l-Alanin, Diäthylamin, Guanidincarbonat sowie Methylenblau.

Außerdem haben wir untersucht, welchen Einfluß die absolute Konzentration von Zucker und Alkalisator auf den Verlauf der Reaktion ausübt, nachdem von Neuberg und Hirsch (l. c.) schon früher festgestellt worden war, daß das relative Verhältnis von Alkalisator zu Kohlenhydrat insofern bestimmend wirkt, als mit vermehrter Alkalisatorkonzentration der Umsatz des Zuckers nach der dritten Vergärungsform im großen und ganzen erhöht wird.

Bei Ansätzen mit Dikaliumphosphat konnten wir die diesbezüglichen Angaben von Neuberg und Hirsch bestätigen. Bei gleichbleibendem Gehalt der Maischen an Zucker, nämlich 10%, steigerten wachsende Zugaben von Dikaliumphosphat, dessen Gehalt von $^1/_4$ über $^3/_8$ auf $^2/_4$ Mol. zunahm, die Ausbeuten an Glycerin und Essigsäure, welche für die dritte Vergärungsform charakteristisch sind.

In einer anderen Serie gleichfalls mit Dikaliumphosphat wurden bei ebenso belassenen Molaritäten an Alkalisator die Zuckermengen variiert, und zwar derart, daß $^2/_4$ Mol. K_2HPO_4 in einer 10proz. Zuckerlösung, $^2/_8$ Mol. K_2HPO_4 in einer 5proz., $^1/_4$ Mol. K_2HPO_4 in einer 3,33proz. Zuckerlösung vorhanden waren. Das Ergebnis war, daß diese Abwechslung nur einen geringen Einfluß ausübt, d. h. mit anderen Worten, daß hier der Eintritt der dritten Vergärungsform mehr vom Gehalt an Alkalisator als von der Zuckerkonzentration abhängt.

Digitized by Google

Durch eingehende Versuche mit Natriumbicarbonat überzeugten wir uns davon, daß die Ausbeuten an Glycerin und Essigsäure gleichfalls von der Alkalisatormenge bedingt werden.

Zu bemerkenswerten Ergebnissen führte die Untersuchung des kohlensauren Ammoniaks in seinem Einflusse auf die Gärung. Hier sind wir zu den höchsten Ausbeuten an Essigsäure und Glycerin gelangt, die bisher überhaupt bei unserer dritten Vergärungsform erzielt worden sind. Sie stiegen im günstigsten Fall für Essigsäure auf 7,3 und für Glycerin auf 21,1 Gewichtsprozente = 41,3% der theoretischen Möglichkeit. Ganz wie bei den fixen Alkalien wird auch dabei der Ertrag von der Menge des zugefügten Alkalisators durchaus bestimmt. — Man wird auf diese Verhältnisse in Zukunft achten müssen, sobald alkalische Ammoniakverbindungen zur Hefenernährung herangezogen werden.

Eine ähnlich gute Wirkung beobachteten wir für das Kaliumpyrophosphat, das wie die primären, sekundären und tertiären Phosphate[1]) eine weitgehende Zurückdrängung der ersten Vergärungsform veranlaßt und recht günstige Bedingungen für die dritte Vergärungsform schafft.

Hinsichtlich der weiteren von uns geprüften rein anorganischen Salze, des NaSH, des Na_3SbS_4, des Na_3AsO_4 sowie des Na_2SiO_3 können wir uns kurz fassen. Sie alle sind Erreger der dritten Vergärungsform. Keinen Einfluß konnten wir beim Natriumbenzoat feststellen, während oleinsaures Natron deutlich wirksam war.

Es lag uns nun daran, nicht nur einfache Mineralstoffe oder Salze der Alkalien mit organischen Säuren anzuwenden, sondern auch organische Basen in den Bereich der Prüfung zu ziehen.

Es zeigte sich, daß kohlensaures Guanidin sowie freies Diäthylamin ziemlich und d, l-Alanin (α-Aminopropionsäure) schwach wirksam war; dem Methylenblau hingegen ging ein deutlicher Einfluß ab. Wie zu erwarten war, kann die Hefe von den eigentlichen organischen Basen, Guanidin und Diäthylamin, nur verhältnismäßig wenig vertragen; die größere Giftigkeit dieser Stoffe dürfte mit den Permeabilitätszuständen zusammenhängen. —

[1]) Vgl. C. Neuberg und J. Hirsch, l. c.

Digitized by Google

Wir haben somit eine große Reihe von Substanzen kennengelernt, die den normalen Kohlenhydratumsatz in qualitativer und quantitativer Beziehung ganz erheblich abändern. Die Betrachtung der Ergebnisse führt zu dem nicht unwichtigen Schluß, daß die wirklichen Alkalisatoren mineralischer oder organischer Natur sowie gemischten Charakters allgemein die alkoholische Gärung im selben Sinne beeinflussen, und zwar so, daß sie die biochemische Spaltung des Zuckers nach der Gleichung der dritten Vergärungsform herbeiführen.

Experimentelle Bedingungen.

Vergoren wurde bis auf die besonders gekennzeichneten Fälle stets eine 10 proz. Saccharoselösung. Der Zucker wurde zusammen mit dem betreffenden Alkalisator in Leitungswasser gelöst; zu dieser Flüssigkeit wurde zumeist die dem einfachen bis doppelten Gewichte des Zuckers entsprechende Menge Oberhefe zugesetzt und durch kräftiges Umschütteln gleichmäßig verteilt. Die Maische wurde dann auf ein bestimmtes Volumen mit Leitungswasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde in einer mit einem Gäraufsatz versehenen Flasche in den Brutschrank gestellt, dessen Temperatur bei 35—37° gehalten war.

Je nach der Konzentration und Giftwirkung des Alkalisators begann die Gärung nach 1—3 Stunden und erlosch in der Regel innerhalb 24—96 Stunden. Um zu erfahren, ob der gesamte Zucker vergoren war, wurde eine abgemessene Menge dem Gärgut entnommen, klar filtriert und mit alkalischer Kupferlösung auf Zucker geprüft. In einigen Fällen, wo die Reduktion durch den anwesenden Alkalisator gestört wurde, mußte dieser fortgeschafft werden, bevor man die Fehlingsche Probe ausführte. War die Entfernung des Alkalisators nicht angängig, so wurde durch Polarisation nach vorhandenem Zucker gefahndet. War solcher noch zugegen, so wurde dem Gärgut weiter eine bestimmte Menge Hefe hinzugefügt und diese wieder durch kräftiges Umschütteln gleichmäßig suspendiert, wodurch dann meist der gesamte Zucker zur Umsetzung gelangte. Darauf wurde das Volumen des Gärgutes festgestellt. Unter Berücksichtigung der entnommenen kleinen Mengen konnte der ursprüngliche Zucker-

Digitized by Google

gehalt für je 100 ccm des Gärguts berechnet werden. In dem Filtrat wurden sodann die Gärprodukte Alkohol, Glycerin und Essigsäure quantitativ nach den Methoden bestimmt, die für die vorliegenden besonderen Verhältnisse geboten sind. Die Ausbeuten sind stets in Prozenten der mit dem angewendeten Rohrzucker eingeführten Hexosenmenge angegeben.

Methodik.

Das Glycerin wurde nach dem Jodidverfahren ermittelt, wobei die nicht flüchtigen Zusätze durch Behandlung mit Alkohol und Äther beseitigt wurden[1]). Zugleich wurden auch die sonst störend wirkenden Schwefelverbindungen im Falle des Sulfhydrats und des Sulfantimoniats entfernt.

Die quantitative Bestimmung des Alkohols geschah pyknometrisch bei 15°. Aus einer abgemessenen Menge Gärgut wurde durch anreichernde Destillation der Alkohol übergetrieben. Man destillierte z. B. von 300 ccm Gärgut 200 ccm ab, von diesen wiederum 135 ccm und brachte zum Schluß das Volumen auf 100 ccm, die neutrale Reaktion aufweisen mußten.

Bei Anwesenheit schwefelhaltiger Körper wurde eine Rectification über Kupfersulfat oder alkalischer Bleilösung eingeschaltet.

Zur Analyse der Essigsäure wurde ein bestimmtes Quantum der ausgegorenen und filtrierten Maische mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade weit eingeengt. Darauf wurde die Flüssigkeit mit H_2SO_4 wieder kongosauer gemacht, und aus der verhältnismäßig konzentrierten Lösung wurde nun die Essigsäure anfangs durch Kochen, dann durch Wasserdampf übergetrieben. Das Destillat wurde in Anteilen aufgefangen. Mit dem ersten Liter gingen dabei meist drei Viertel der gesamten Essigsäure über, die mit NaOH titrimetrisch festgestellt wurde. Die nächsten Portionen zeigten dann sehr rasch abnehmende Säurewerte, so daß man sich mit 3 Litern Destillat in der Regel begnügen konnte.

Versuchsreihe I.

Der Gehalt an Zucker war in dieser Serie immer 10%; während die Konzentrationen des Alkalisators sich wie 3 : 1,5 : 1 verhielten.

a) 100 g Rohrzucker und 130,7 g Dikaliumphosphat wurden in ca. 800 ccm Leitungswasser gelöst; darin wurden 100 g obergärige Hefe M suspendiert und das Volumen auf 1000 ccm gebracht. Der molekulare Gehalt an K_2HPO_4 war = $^3/_4$. Da nach 3 Tagen eine filtrierte Probe von 15 ccm noch Fehlingsche Mischung reduzierte, wurden 100 g Hefe nachgegeben. Nach weiteren 36 Stunden war aller Zucker umgesetzt. Das

[1]) Näheres s. bei Neuberg und Reinfurth sowie Neuberg und Hirsch a. a. O.

Digitized by Google

Volumen belief sich zum Schluß auf 1085 ccm; darin waren also die Gärprodukte von 98,5 g Rohrzucker = 103,6 g Monosacchariden [1]) zugegen. Die Ausbeuten betrugen für je 100 ccm:

an Alkohol: 2,956 g = 30,9% der angewendeten Hexosenmenge,
an Glycerin: 1,495 g = 15,6% „ „ „ .
an Essigsäure: 0,489 g = 5,1% „ „ „ .

b) Der Ansatz enthielt 100 g Zucker, 65,4 g K_2HPO_4 und 100 g Hefe M auf 1 l Gärgut. Nach 3 Tagen war alles Kohlenhydrat vergoren. Die Maische hatte ein Volumen von 1000 ccm; Gehalt an $K_2HPO_4 = {}^3/_8$ m.

Für je 100 ccm Gärgut ergaben die Analysen einen Betrag

an Alkohol: 3,640 g = 34,6% des vorhanden gewes. 6-Kohlenstoffz.,
an Glycerin: 1,418 g = 13,5% „ „ „ „
an Essigsäure: 0,443 g = 4,2% „ „ „ „

c) 100 g Rohrzucker, 43,6 g K_2HPO_4 und 100 g Hefe; Volumen 1000 ccm. Die Molarität des Phosphats war = $^1/_4$. Nach 36 Stunden war der Zucker verschwunden. Das Endvolumen machte 1000 ccm aus.

Die Alkoholbestimmung in 300 ccm Gärgut führte zu 11,50 g Alkohol = 36,4% der gesamten Zuckermenge.

An Glycerin wurden in 100 ccm Gärgut gefunden: 1,112 g = 10,6% des Zuckers.

Die in 300 ccm Gärgut gebildete Essigsäure war 1,03 g; das sind 3,3% vom Kohlenhydrat.

Die Ergebnisse des Versuchs 1 sind in der Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I.

Konzentration an		Ausbeute in % an		
K_2HPO_4	Zucker	Alkohol	Glycerin	Essigsäure
$^3/_4$ m	10%	30,9	15,6	5,1
$^3/_8$ „	10 „	34,6	13,5	4,2
$^1/_4$ „	10 „	36,4	10,6	3,3

Es zeigt sich hier die Abnahme des Alkohols und die Vermehrung von Glycerin und Essigsäure mit steigender Konzentration des Dikaliumphosphats; mit dieser wächst auch die Vergärungsdauer.

Versuchsreihe 2.

Diese Serie entspricht den Versuchen 1 a) bis c), nur daß die Konzentrationen des Zuckers in 2 a) 10%, 2 b) 5% und 2 c) $3^1/_3$% waren.

---

[1]) 100 g Rohrzucker = 105,25 g Hexosen.

Digitized by Google

a) 150 g Rohrzucker, 196,1 g K_2HPO_4, 150 g Hefe; Volumen 1500 ccm. Die Zuckerlösung war hier also 10%ig, die Konzentrationen des K_2HPO_4 $^3/_4$ m. Da sich nach 36 Stunden die Hefe abgesetzt hatte, aber die Probe mit Fehlingscher Lösung noch positiv ausfiel, so wurden zu 1380 ccm[1]) des ursprünglichen Gärguts 70 g Hefe nachgegeben. Nach weiteren 12 Stunden war der ganze Zucker umgesetzt. Das Volumen betrug 1450 ccm, und ihm entsprachen ursprünglich 138 g Rohrzucker oder 145,3 g Hexosen.

Die Bestimmung des Weingeistes in 300 ccm führte zu 9,85 g Alkohol = 32,8% des umgesetzten Zuckers.

100 ccm Gärgut wurden für die Glycerinbestimmung benutzt und zum Schluß auf 25 ccm gebracht. Die Analyse ergab, daß 1,2363 g Glycerin gebildet worden waren; das sind 12,4% des umgesetzten Hexosenquantums.

100 ccm Gärgut lieferten 0,4091 g Essigsäure oder 4,1%.

b) 60 g Rohrzucker, 78,4 g K_2HPO_4 und 60 g Hefe. Das Volumen machte 1200 aus. Die Saccharoselösung war also 5proz., während die Konzentration des Phosphats $^3/_8$ m war. Vergärungsdauer $1^1/_2$ Tage.

Die Alkoholbestimmung wurde diesmal der größeren Verdünnung wegen mit 500 ccm Gärgut ausgeführt, welche 9,13 g Alkohol enthielten. Dies sind 34,7% der Gesamthexosen.

Das in 200 ccm Gärgut sich vorfindende Glycerin wurde auf 25 ccm gebracht, von denen wir 3 ccm zu den Analysen verwendeten; sie ergaben 0,1334 g Glycerin. Die Menge des in 200 ccm Gärgut vorhandenen Glycerins berechnet sich auf 1,112 g oder 10,6% der eingemaischten Kohlenhydrate.

Aus 100 ccm Gärgut wurden 0,1572 g Essigsäure = 3,1% erhalten.

c) 50 g Rohrzucker und 65,3 g K_2HPO_4 wurden in ca. 1 l Wasser gelöst, dazu wurden 50 g Hefe M gegeben und das Volumen auf 1500 ccm aufgefüllt. Der Zucker war nach 18 Stunden vergoren. Man hatte eine $^1/_4$ m Lösung von K_2HPO_4 gehabt.

700 ccm Gärgut dienten zur Alkoholbestimmung, die 8,7 g Alkohol = 35,4% vom Zucker ergab.

Für die Glycerinanalyse wurden 300 ccm Gärgut verarbeitet; darin waren 1,073 g = 10,2% enthalten.

An Essigsäure wurde in 200 ccm Gärgut 0,1949 g oder 2,8% gefunden.

In der folgenden Tabelle II sind die Resultat eder Versuchsreihe 2 zusammengestellt.

Man erkennt, wie bei der Reihe 1, so auch hier, daß mit zunehmender Konzentration der OH-Ionen die dritte Vergärungsform mehr und mehr in den Vordergrund tritt. Ein wesentlicher Unterschied gegen die Versuchsreihe 1 ist nicht vorhanden.

---

[1]) 120 ccm waren anderweitig verbraucht.

Digitized by Google

Tabelle II.

Konzentration an		Ausbeute in % an		
K_2HPO_4	Zucker	Alkohol	Glycerin	Essigsäure
$^3/_4$ m	10%	32,8	12,4	4,1
$^3/_8$ „	5 „	34,7	10,6	3,1
$^1/_4$ „	$3^1/_3$ „	35,4	10,3	2,8

Versuchsreihe 3.

a) 200 g Rohrzucker und 168 g Natriumbicarbonat wurden bei 37° in ca. 1500 ccm Leitungswasser gelöst, mit 200 g obergäriger Hefe M versetzt und alsdann auf das Volumen von 2 l gebracht. Die Konzentration des Bicarbonats war also 1 m. Nach 36stündigem Stehen im Brutschrank bei 37° hatte sich die Hefe gesenkt. Da die Fehlingsche Probe mit einer kleinen Menge von 5 ccm positiv ausfiel, so wurden zu 1400 ccm Gärgut (600 ccm waren zu Anfang für den späteren Versuch 3b entnommen worden) 150 g Hefe nachgegeben. Nach weiteren 10 Stunden war aller Zucker umgesetzt. Das Volumen betrug 1550 ccm, in denen ursprünglich 139,5 g Rohrzucker vorhanden gewesen waren.

300 ccm Gärgut, entsprechend 27,0 g Rohrzucker = 28,42 g Monosacchariden, wurden durch anreichernde Destillation auf 100 ccm gebracht. Diese enthielten 10,3 g Alkohol; das sind 36,2% des angewandten Zuckers.

Zur Glycerinbestimmung dienten 100 ccm Gärgut. Zum Schlusse wurde die gereinigte Glycerinlösung auf 25 cm aufgefüllt; davon wurden 3,0 ccm zur Analyse benutzt. Diese lieferten 0,1288 g Glycerin. In 100 ccm Gärgut waren also $0{,}1318 \cdot {}^{25}/_3 = 1{,}098$ Glycerin = 11,6% vorhanden.

Für die Ermittelung der Essigsäure wurden 150 ccm Gärgut verwendet. Gefunden wurden: 0,5544 g Essigsäure = 3,9%.

b) Die gleich zu Anfang entnommenen 600 ccm der Maische 3a wurden auf 1800 ccm aufgefüllt. Diese enthielten nun 60 g Rohrzucker, 50,4 g $NaHCO_3$ und 60 g Hefe. Die Konzentration des Bicarbonats war also $^1/_3$ m, die Zuckerlösung war $3^1/_3$ proz. Das Kohlenhydrat war nach 24 Stunden bereits vergoren.

Zur Alkoholbestimmung wurden 600 ccm,
„ Glycerinbestimmung wurden 300 ccm und
„ Essigsäurebestimmung wurden 500 ccm
benutzt.

Gefunden wurden in den obigen Mengen Gärgut:

Alkohol: 8,730 g = 41,4% des angewendeten Zuckers,
Glycerin: 0,709 g = 6,8% „ „ „ „
Essigsäure: 0,380 g = 2,25% „ „ „ „

Die nachstehende Tabelle III zeigt das Hervortreten der dritten Vergärungsform mit zunehmender Konzentration des Bicarbonats.

Digitized by Google

Tabelle III.

Konzentration an		Ausbeute in % an		
$NaHCO_3$	Zucker	Alkohol	Glycerin	Essigsäure
1 m	10,0%	36,2	11,6	3,9
1/3 „	3,3 „	41,4	6.8	2,25

Versuchsreihe 4.

Bei den nun folgenden Gäransätzen wurde kohlensaures Ammoniak als Alkalisator der Maische zugesetzt. Das Ammoniumcarbonat[1]) enthielt 21,6% NH_3, entsprach also fast genau dem doppelt kohlensaurem Ammon. Es handelte sich hier wie in allen späteren Fällen darum, die größtmöglichste Dosis zu ermitteln, die von der Hefe überhaupt vertragen wurde, wenn die Gärung etwa in 2 Tagen beendet sein sollte. Durch qualitative Vorversuche wurde festgestellt, daß die höchste anwendbare Konzentration 40 g des vorliegenden Salzes, entsprechend 8,64 g NH_3, im Liter war.

50 g Rohrzucker und 20 g Ammoniumbicarbonat wurden in ca. 350 ccm Wasser gelöst; nach Zufügung von 100 g Hefe M wurde durchgeschüttelt und ein Volumen von 500 ccm hergestellt. Nach 36 Stunden hatte sich die Hefe abgesetzt, und eine filtrierte Probe von 5 ccm, aus der das Ammoniak weggedampft war, reduzierte noch die Fehlingsche Flüssigkeit. Zur Beendigung der Gärung wurden 30 g Hefe nachgegeben. Nach weiteren 6 Stunden zeigte die Maische dann kein Reduktionsvermögen mehr. Das Volumen betrug zum Schluß 525 ccm, entsprechend einem ursprünglichen Gehalt von 49,5 g Rohrzucker = 52,1 g Hexosen.

Da Ammoniak das aus der Fehlingschen Mischung entstehende Kupferoxydul löst, mußten die Proben, die zur Feststellung des Vergärungsgrades entnommen wurden, zunächst vom NH_3 (durch Austreiben desselben auf dem Wasserbade) befreit werden.

Die Alkoholbestimmung wurde in 250 ccm Gärgut vorgenommen, das mit H_2SO_4 schwach angesäuert wurde, um zu verhindern, daß Ammoniak mit in die Vorlage überging; das Alkohol-Wassergemisch wurde dann wie gewöhnlich auf 100 ccm konzentriert. Zum Schlusse wurde noch in einer abgemessenen Menge mit Neßlers Reagens auf NH_3 geprüft. Diese Probe fiel negativ aus.

Der Alkoholgehalt betrug 6,73 g, entsprechend 27,1 % der im Rohrzucker angewendeten Hexosenmenge.

[1]) Über die frühere Verwendung von kohlensaurem Ammoniak, bei der den Autoren jedoch nichts Besonderes aufgefallen war, siehe bei Neuberg und Hirsch, diese Zeitschr. **96**, 179; über die Benutzung von freiem Ammoniak siehe H. v. Euler, H. **100**, 69.

Digitized by Google

Die Glycerinbestimmung wurde in 50 ccm Gärgut vorgenommen. Bei den verschiedenen Eindampfungen verflüchtigte sich das Ammoniak. Die 50 ccm enthielten 0,92 g Glycerin; das sind 18,5% der angesetzten Monosaccharide.

Zur Bestimmung der Essigsäure reichte in diesem Falle das Material nicht aus.

Versuchsreihe 5.

a) Der vorige Versuch wurde nun mit 100 g Zucker, 40 g Ammoncarbonat sowie 200 g Hefe M wiederholt. Das Volumen wurde zu 1000 ccm ergänzt. Wegen der vorzüglichen Beschaffenheit der Hefe war der ganze Zucker bereits nach 15 Stunden vollkommen umgesetzt; man muß auch daran denken, daß das Ammoncarbonat als wertvolle Stickstoffnahrung der Hefe das günstige Ergebnis mit herbeigeführt haben kann.

Die Ausbeute an Alkohol aus 300 ccm betrug 9,13 g = 28,9%.

Die Glycerinanalyse in 100 ccm Gärgut ergab 2,22 g = 21,1% des Zuckers; das sind 41,3% der theoretischen Möglichkeit.

Die zur Essigsäurebestimmung benutzten 300 ccm enthielten 2,290 g = 7,2%.

b) 100 g Rohrzucker und 20 g Ammoncarbonat = 4,3 g NH_3 wurden in 600 ccm Wasser gelöst; zu der Flüssigkeit gab man 150 g Hefe und brachte das Volumen nach dem Umschütteln auf 1000 ccm. Nach 15 Stunden war aller Zucker umgesetzt.

300 ccm Gärgut wurden wieder über H_2SO_4 auf 100 ccm destilliert. Diese enthielten 13,20 g Alkohol = 41,8%.

Zur Glycerinbestimmung wurden 100 ccm Gärgut auf 25 ccm eingeengt. Die Analyse ergab 0,939 g Glycerin = 8,9% des Zuckers.

An Essigsäure wurden in 300 ccm 0,8948 g = 2,8% gefunden.

c) Versuch c wurde mit einer weiter verringerten Menge von Ammoniumcarbonat vorgenommen und enthielt 100 g Rohrzucker, 13,3 g kohlensaures Ammoniak (= 2,87 g NH_3) sowie 100 g Hefe M auf 1000 ccm. Nach 15 Stunden war, ebenso wie Versuch a und b, auch dieser Ansatz ausgegoren.

300 ccm Gärgut wurden durch Destillation über H_2SO_4 und dann über KOH konzentriert und ergaben 13,68 g Alkohol = 43,3%.

100 ccm Gärgut enthielten 0,767 g Glycerin = 7,3%.

300 ccm Gärgut lieferten 0,573 g Essigsäure = 1,8 %.

Die Ergebnisse der Versuche 5 a) bis c) sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabelle IV.

Im Liter g		Ausbeute in % an		
Ammoncarbonat	Zucker	Alkohol	Glycerin	Essigsäure
40	100	28,9	21,1	7,2
20	100	41,8	8,9	2,8
13,3	100	43,3	7.3	1,8

Digitized by Google

Die Nebeneinanderstellung der Zahlenwerte der Tabelle IV bekräftigt auch für das kohlensaure Ammoniak die bereits gemachte Erfahrung, daß mit wachsender Konzentration des Alkalisators die Glycerin- und Essigsäuremenge vermehrt, die Ausbeute an Alkohol dagegen herabgesetzt wird.

Bemerkenswert ist, daß bei den geringeren Mengen kohlensauren Ammoniaks die dritte Vergärungsform nur in minderem Maße zum Ausdruck kam. Wahrscheinlich wird Ammoniak zum Aufbau der Hefenzellen benutzt. Besonders fällt im Versuch c der zu kleine Wert für die Essigsäure auf. Man wird mit der Annahme nicht fehlgehen, daß dieses Defizit auf den internen Verbrauch[1]) der Essigsäurevorstufen (Brenztraubensäure und Acetaldehyd) zurückzuführen ist. Da die Hefe sehr kräftig war, so waren die Ansätze über Nacht restlos vergoren. Berechnet man noch die bei der Gärung nach beiden Umsatzformen entstandene Kohlensäure, so findet man hier eine mindestens ebenso gute Bilanz[2]) des Zuckerumsatzes wie bei den übrigen anorganischen Alkalisatoren.

Die folgenden Versuche wurden in Anwesenheit von Kaliumpyrophosphat $K_4P_2O_7 \cdot 3\,H_2O$ ausgeführt. Durch qualitative Proben war festgestellt worden, daß die Konzentration, die von der Hefe vertragen wurde, eine $^3/_4$ molare war, d. h. 288,4 g im Liter ausmachte. Bei höherem Gehalt kam die Gärung gar nicht in Gang oder die Hefe setzte sich nach kurzer Zeit wirkungslos ab.

Versuchsreihe 6.

a) Es waren 100 g Zucker, 288,4 g $K_4P_2O_7 \cdot 3\,H_2O$ und 100 g Hefe in 1 l enthalten. Nach 26stündigem Stehen im Brutschrank war die Gärung erloschen, aber noch Zucker zugegen. Nach Zusatz von 100 g Hefe und Verlauf von weiteren 36 Stunden bestand noch immer ein Reduktionsvermögen. Aus diesem Grunde wurden abermals 50 g Hefe zugeführt. Darauf war nach 12 Stunden die Gärung beendet. Das Volumen betrug 1140 ccm, denen 99 g Rohrzucker = 104,2 Hexosen entsprachen.

Die Ausbeute

an Alkohol	aus 300 ccm	war	7,800 g	= 28,5%,
an Glycerin	„ 100 „	„	1,702 g	= 18,6%,
an Essigsäure	„ 300 „	„	1,722 g	= 6,3%.

b) 100 g Rohrzucker, 144,2 g $K_4P_2O_7 \cdot 3\,H_2O$ und 100 g Hefe; Volumen 1000 ccm. Nach eintägigem Stehen bei 35° erfolgte Nachfüllung

[1]) Siehe hierüber bei Neuberg und Hirsch, diese Zeitschr. **100**, 320. 1919.

[2]) Vgl. Neuberg, Hirsch und Reinfurth, diese Zeitschr. **105**, 307. 1920.

Digitized by Google

von 100 g Hefe, worauf nach weiteren 40 Stunden die Umsetzung vollständig war.

Die Alkoholermittelung ergab 32,0% und die Glycerinbestimmung in 100 ccm Gärgut 1,219 g = 12,8%, während in 250 ccm 1,002 g oder 4,2% des Zuckers an Essigsäure gefunden wurden.

c) 100 g Zucker, 96,1 g Kaliumpyrophosphat und 100 g Hefe; Volumen 1000 ccm. Da die Maische nach Verlauf von 36 Stunden noch reduzierte (Probe mit 10 ccm), wurden 50 g Hefe nachgegeben. Das Volumen betrug nach dem vollständigen Zerfall des Zuckers (am zweiten Tage) 1040 com, so daß also die Gärprodukte aus 99 g Saccharose = 104,2 g Hexosen vorhanden waren.

Die Ausbeuten beliefen sich

an Alkohol auf 33,2%,
an Glycerin „ 11,9%,
an Essigsäure „ 3,9%.

Für den Ausfall der Versuchsreihe 6 geben wir wieder eine tabellarische Übersicht (V). Auch hier gewinnt man ein völlig eindeutiges Bild: Verhältnismäßig kleine Ausbeuten an Alkohol und um so stärkere Steigerungen der Glycerin- sowie Essigsäurebildung, je größer die Menge des anwesenden Pyrophosphats ist.

Tabelle V.

Konzentration an		Ausbeute in % an		
$K_4P_2O_7$	Zucker	Alkohol	Glycerin	Essigsäure
$^3/_4$ m	10%	28,5	18,6	6,3
$^3/_8$ „	10 „	32,0	12,8	4,2
$^1/_4$ „	10 „	33,2	11,9	3,9

Im folgenden wurde aus Sparsamkeitsrücksichten, insbesondere wegen der Kostbarkeit des Zuckers, darauf verzichtet, mehrere Konzentrationen eines und desselben Alkalisators zu untersuchen; vielmehr wurde nur diejenige Menge der basischen Verbindung zur Anwendung gebracht, die für die Hefe eben noch erträglich war. Man erhielt auf diese Weise also immer die größte, mit dem betreffenden Alkalisator gerade zu erreichende Verschiebung, d. h. das Zurückweichen der ersten zugunsten der dritten Vergärungsform.

Als nächster Alkalisator diente das Schlippesche Salz, Natriumsulfantimoniat $Na_3SbS_4 \cdot 9\,H_2O$. Die hiermit an-

Digitized by Google

gestellten Vorversuche hatten ergeben, daß die Menge der Verbindung, die unsere Oberhefe vertrug, 35 g im Liter war. Da durch die Gärungskohlensäure Antimonsulfid gefällt wurde und Schwefelwasserstoff auftrat, so mußte sowohl die Destillation des Alkohols als auch die der Essigsäure über Kupfersulfat vorgenommen werden.

Versuchsreihe 7.

100 g Zucker, 35 g Schlippesches Salz sowie 100 g Hefe zum Volumen von 1000 ccm. Nach 30stündigem Verweilen im Brutschrank hatte sich die Hefe abgesetzt, und eine Probe von 5 ccm, aus welcher der Schwefelwasserstoff durch Kupfersulfat und das Kupfersulfid dann durch Filtrieren entfernt war, reduzierte Fehlingsche Lösung. Zur Beendigung der Gärung wurden 50 g Hefe nachgegeben. Nach weiteren 20 Stunden war der ganze Zucker verschwunden. Das Endvolumen betrug 1045 ccm, entsprechend einem ursprünglichen Saccharosegehalt von 99,5 g = 104,7 g Hexosen.

300 ccm Gärgut wurden mit überschüssigem $CuSO_4$ destilliert; das Destillat wurde auf 100 ccm konzentriert. Der Alkoholgehalt war 12,19 g = 40,6%.

Zur Glycerinanalyse wurden 100 ccm verwendet. Dabei sind keine besonderen Maßnahmen notwendig, soweit der Schwefelwasserstoff im Faust-Heimschen Verdunstungsapparat mit entweicht und bei der weiteren Behandlung mit Äther-Alkohol die Sulfide entfernt werden. Es wurden 0,997 g Glycerin gefunden, entsprechend 10,0% vom Gewicht des Zuckers.

Die Essigsäurebestimmung mit 200 ccm wurde, wie erwähnt, ebenfalls unter Kupfersulfatzusatz vorgenommen und lieferte 0,6696 g = 3,3% Essigsäure.

Qualitative Vorversuche mit Natriumsulfhydrat, NaSH, hatten gelehrt, daß die Höchstmenge dieser Substanz 14 g im Liter betragen durfte, wenn die Vergärung etwa in 3 Tagen vollendet sein sollte. Dieses Quantum wurde in der Weise hergestellt, daß man eine Lösung von 10 g reinstem Natriumhydroxyd mit Schwefelwasserstoff sättigte. Der folgende Versuch 8 wurde also mit dieser Menge Sulfhydrat im Liter ausgeführt.

Versuchsreihe 8.

100 g Zucker, 14 g NaSH, 150 g Hefe; Volumen: 1000 ccm. Nach 24 Stunden hatte sich die Hefe abgesetzt, und es wurde, da von den qualitativen Vorversuchen her die Notwendigkeit einer weiteren Zugabe von Hefe bekannt war, noch eine Menge von 100 g Hefe der Maische zugefügt. Die Gärung kam darauf bald wieder in Gang, stand jedoch nach abermals einem Tage erneut still. Eine Probe von 5 ccm, aus welcher der Schwefel-

Digitized by Google

wasserstoff mit Kupfersulfat beseitigt war, reduzierte Fehlingsche Flüssigkeit und machte einen zweiten Zusatz von 100 g Hefe nötig. Nach 18 Stunden war dann die Gärung zu Ende; das Volumen betrug 1195 ccm, die einem ursprünglichen Rohrzuckergehalt von 99,55 g = 104,8 g Hexosen äquivalent waren.

Auch hierbei wurden die zu den Analysen dienenden Anteile des Gärguts mit Kupfersulfat bzw. Bleisalz behandelt.

An Alkohol wurden in 300 ccm 10,92 g = 41,5% festgestellt.

Die in 100 ccm gefundene Glycerinmenge im Gewicht von 0,713 g macht einen Prozentsatz von 8,2% aus.

In 300 ccm Gärgut waren 0,702 g Essigsäure = 2,7% zugegen.

Zu den weiterhin verwendeten Alkalisatoren gehörte das Trinatriumarsenat, Na_3AsO_4, von dem unsere Hefe eine verhältnismäßig große Menge vertrug, nämlich 75 g im Liter. Das Salz war hergestellt worden durch Vermischen einer Lösung von nahezu 100 proz. Arsensäure mit der äquivalenten Menge reinsten Natriumhydroxyds (Merck, pro analysi)

Versuchsreihe 9.

100 g Zucker, 75 g Na_3AsO_4, 100 g Hefe zum Volumen von 1000 ccm. Da die Gärung nur langsam fortschritt, wurden nach 24 Stunden nochmals 200 g Hefe der Maische zugesetzt. Die CO_2-Entwickelung ging darauf so stürmisch vor sich, daß ein Teil der Maische während der Nacht überfloß. Die Hefe hatte sich nach 15 Stunden gesenkt, aber eine Probe von 5 ccm zeigte noch immer vorhandenen Zucker an. Infolgedessen wurden 50 g Hefe zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte keine Reduktion der Fehlingschen Mischung mehr. Das Volumen der Lösung war am Ende gerade 1000 ccm. Vor Zufügung der letzten 50 g Hefe waren noch 950 ccm vorhanden gewesen. Diese entsprachen unter Berücksichtigung des erlittenen Verlustes einem Gehalte von 79,1 g Saccharose. 100 ccm Gärgut enthielten zum Schluß also die Vergärungsprodukte von 7,91 g Rohrzucker = 8,33 g Hexosen.

Die Alkoholbestimmung in 300 ccm Gärgut ergab 10,96 g = 43,8%.

Bei der Ermittelung des Glycerins in 100 ccm Gärgut wurden 0,460 g = 5,5% gefunden.

In 300 ccm Gärgut waren 0,474 g Essigsäure = 1,9% der umgesetzten Hexosen zugegen.

Das Natriumsilicat ist als Salz der schwachen Kieselsäure eine stark alkalisch reagierende Verbindung. Verwendet wurde als Alkalisator ein hygroskopisches Metasilicat der Zusammensetzung Na_2SiO_3. Die Vorversuche hatten gezeigt, daß

Digitized by Google

die dosis tolerata dieses Salzes pro Liter 20 g, enthaltend 9,08 g wasserfreies Na_2SiO_3, war. Durch die bei der Gärung entwickelte Kohlensäure wurde gallertige Kieselsäure ausgeschieden.

Versuchsreihe 10.

100 g Zucker, 20 g Natriummetasilicat sowie 100 g Hefe; Volumen: 1000 ccm. Nach 22 Stunden hatte die Hefe sich abgesetzt, eine Probe von 5ccm hatte alkalische Kupferlösung noch reduziert. Es wurden 100 g Hefe nachgegeben. Nach einem weiteren Tage fiel die Fehlingsche Probe negativ aus. Das Endvolumen war 1090 ccm, entsprechend einem ursprünglichen Gehalt von 99,5 g Saccharose = 104,7 g Sechskohlenstoffzucker.

300 ccm Gärgut wurden, ohne vorher filtriert zu werden, anreichernd auf 100 ccm destilliert und enthielten 12,11 g Alkohol. Dies sind in Prozenten vom umgesetzten Zucker ausgedrückt 42,0%.

Da das entstandene Kieselsäuregel die Filter verstopfte, so wurden für die Glycerin- und Essigsäurebestimmung 500 ccm Gärgut mit Alkohol auf 1000 ccm gebracht. Dadurch gelang es, die Kieselsäure samt der Hefe zum Ausflocken zu bringen, und die Flüssigkeit lief klar und rasch durch das Filter.

Da das Volumen verdoppelt worden war, so wurden diesmal 200 ccm des Filtrats, entsprechend 100 ccm des ursprünglichen Gärguts, zur Glycerinbestimmung benutzt. Sie lieferten 0,6517 g Glycerin = 6,8 %.

Für die Essigsäureanalyse wurden 500 ccm des Filtrats, äquivalent 250 ccm des ursprünglichen Gärguts, verarbeitet. Sie enthielten 0,498 g oder 2,1% des umgesetzten Zuckers an Essigsäure.

Die nachstehenden Versuche hatten den Zweck, den Einfluß verschiedener organischer Basen und einiger alkalisch reagierenden organischen Salze zu prüfen.

Zu bemerken ist, daß von allen organischen Substanzen nur relativ kleine Quantitäten zur Anwendung gelangen konnten, da sonst überhaupt keine Gärung zustande kam. Die Verhältnisse liegen ähnlich wie bei dem jüngst von C. Neuberg und E. Reinfurth[1]) beschriebenen „Dimedonverfahren", wo auch ein organisches Reagens zum Eingriff in den Gärungsvorgang dient. Wegen der kleinen Mengen der betreffenden Alkalisatoren war die Alkalinität des Gärguts nicht sehr stark. Immerhin war aber auch hier in mehreren Fällen die Glycerinbildung auf das 2—3fache des gewöhnlichen Betrages gesteigert.

Zunächst wurden einige Salze schwacher organischer Säuren untersucht.

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. **106**, 281. 1920.

Digitized by Google

Versuchsreihe 11.

70 g Zucker, 17,5 g benzoesaures Natrium, 100 g Hefe zum Volumen von 700 ccm. Nach 18 Stunden wurden zur Maische nochmals 50 g Hefe gefügt. Die Vergärung war nach weiteren 24 Stunden beendet. Das Volumen betrug 750 ccm.

Die Alkoholanalyse wurde mit 250 ccm Gärgut ausgeführt: sie enthielten 11,65 g = 47,4% Alkohol, bezogen auf die vergorene Hexosenmenge.

Die Glycerinbestimmung in 100 ccm Gärgut ergab 0,2875 g. Dies sind 2,9% des Zuckers.

Da Benzoesäure ebenso wie Essigsäure mit Wasserdampf flüchtig ist, so wurde aus 250 ccm Gärgut, welche zuvor stark eingeengt waren, die Benzoesäure mit H_2SO_4 ausgefällt, abfiltriert und gut ausgewaschen, damit keine Essigsäure verloren ging. Da nun noch etwas Benzoesäure in Lösung war, so wurde die wässerige Flüssigkeit mit Benzol mehrfach ausgeschüttelt. Die Benzoesäure geht in Benzol über, während verdünnte Essigsäure dies kaum tut. Die Essigsäure wurde dann, wie üblich, mit Wasserdampf abgetrieben, und es ergab sich ein Wert von 0,558 g Essigsäure, was 2,2% des Zuckers ausmachen würde. Diese Zahl ist gegenüber dem Ertrag an Glycerin zu hoch. Sie erklärt sich teilweise so, daß noch etwas Benzoesäure gelöst geblieben und dann mit übergegangen war.

Versuchsreihe 12.

100 g Zucker, 40 g oleïnsaures Natrium, 150 g Hefe; Volumen: 1000 ccm. Nach 20 Stunden zeigte eine Probe mit 3 ccm noch die Anwesenheit von Zucker an; es wurden daher 100 g Hefe der Maische abermals zugesetzt. Nach weiteren 24 Stunden war aller Zucker vergoren; das Volumen betrug 1100 ccm, entsprechend einem ursprünglichen Gehalt an Rohrzucker von 99,7 g = 104,98 g Hexosen. Von diesen 1100 ccm wurden 1095 ccm (äquivalent 104,5 g Hexosen) mit warmem Barytwasser auf 1400 ccm aufgefüllt, um die Oleïnsäure zu fällen. Hefe und Niederschlag wurden nun abfiltriert und die Gärprodukte im Filtrat bestimmt.

300 ccm desselben wurden auf 100 ccm destilliert und lieferten 9,92 g Alkohol; auf den vorhanden gewesenen Zucker berechnet, sind dies 44,3%.

Zur Glycerinanalyse dienten 100 ccm Filtrat. Sie ergab einen Wert von 0,6133 g = 8,2%.

An Essigsäure wurde in 500 ccm 1,086 g gefunden, entsprechend 2,9%.

Von den rein organischen Alkalisatoren wurde zunächst das Carbonat des Guanidins, einer starken organischen Base, $NH:C(NH_2)_2$, angewendet. Qualitative Vorversuche hatten hier zu dem Ergebnis geführt, daß sich die von unserer Hefe er-

Digitized by Google

tragene Höchstmenge nur auf 10 g kohlensaures Guanidin[1]) im Liter belaufen durfte. Da das Guanidin die Fehlingsche Probe stört, so mußte bei diesen Versuchen davon Abstand genommen werden, auf etwa noch vorhandenen Zucker mit alkalischer Kupferlösung zu prüfen; seine Abnahme wurde daher polarimetrisch kontrolliert.

Versuchsreihe 13.

100 g Zucker, 10 g Guanidincarbonat, 150 g Hefe; Volumen: 1000 ccm. Nach 16 Stunden wurden 100 g Hefe nachgegeben, um die Gärung, die träge verlief, zu Ende zu führen. Nach weiteren 48 Stunden hatte die Hefe sich abgesetzt. Eine klar filtrierte Probe von 5 ccm wies ein schwaches Drehungsvermögen auf. Aus diesem Grunde wurden der Maische noch 50 g Hefe zugefügt. Nach abermals 12 Stunden konnte keine optische Ablenkung mehr konstatiert werden. Das Endvolumen machte 1150 ccm aus, entsprechend 99,55 g Rohrzucker = 104,8 g Monosacchariden.

Aus 300 ccm Gärgut wurden 12,19 g = 44,6 % Alkohol erhalten.

Die Glycerinbestimmung wurde mit 100 ccm Gärgut vorgenommen und ergab 0,776 g = 8,5%, berechnet auf die umgesetzten Hexosen.

Die in 300 ccm Gärgut ausgeführte Essigsäureanalyse lieferte eine Essigsäuremenge von 0,6744 g, was 2,5% vom vergorenen Zucker ausmacht

---

Unter anderen organischen Alkalisatoren wurde auch ein einfaches Amin untersucht, und zwar das Diäthylamin $(C_2H_5)_2NH$. Die damit angesetzten Vorversuche hatten gelehrt, daß das Amin sehr giftig auf die Hefe wirkte und daß nur 3,25 g davon im Liter enthalten sein durften, falls die Gärung nicht sehr rasch wieder zum Stillstand kommen sollte.

Da das Diäthylamin die Ausscheidung des sich bei der Fehlingschen Reaktion bildenden Cu_2O beeinträchtigt, so wurde es vor Anstellung der Probe erst durch Abdampfen auf dem Wasserbade entfernt.

Versuchsreihe 14.

100 g Zucker, 3,25 g Diäthylamin sowie 150 g Hefe zum Volumen von 1000 ccm. Da die Gärung auch hier sehr langsam vor sich ging, so wurden nach Ablauf von 24 Stunden zur Maische noch 100 g Hefe gefügt. Nach weiteren 20 Stunden war die Vergärung beendet. Das Volumen des Gärguts betrug am Schluß 1100 ccm, die den zu Anfang vorhandenen 100 g Rohrzucker entsprachen.

---

[1]) Herrn Prof. Marckwald sind wir für Überlassung eines Quantums Guanidinperchlorat, aus dem wir das Carbonat darstellten, zu Dank verpflichtet.

Digitized by Google

Die Alkoholbestimmung wurde so vorgenommen, daß die dazu benutzten 300 ccm Gärgut zuerst mit Schwefelsäure kongosauer gemacht und dann anreichernd, dabei zuletzt über Lauge, destilliert wurden. Es ergab sich ein Alkoholgehalt von 12,81 g = 44,6%.

In 100 ccm Gärgut waren 0,6756 g Glycerin zugegen, was 7,1% des Zuckers bedeutet.

Die gebildete Essigsäure wurde in 250 ccm Gärgut ermittelt, und zwar fanden sich 0,546 g, entsprechend 2,3%.

Des weiteren sind mit Methylenblau (Base und Chlorhydrat) mehrere Versuche angestellt worden. Es zeigten sich dabei auffallende Erscheinungen. Vorläufig sei nur angeführt, daß diejenigen Ansätze, welche viel Methylenblau, z. B. 150% vom Gewichte des Zuckers, enthielten, restlos und so stürmisch vergoren, daß die Umsetzung nach 2 Stunden bereits vollzogen sein konnte, wenigstens mit einer Oberhefe.

Versuchsreihe 15.

100 g Zucker, 150 g Methylenblau, 100 g untergärige Hefe; Volumen: 1000 ccm. Nach einstündigem Stehen im Brutschrank begann eine außerordentlich heftige CO_2-Entwickelung, die sich aber infolge der geringeren Gärkraft der gerade damals allein zur Verfügung stehenden Unterhefe wieder beruhigte und noch 20 Stunden überhaupt aufhörte. Eine entnommene Probe von 5 ccm wurde mit Knochenkohle entfärbt und reduzierte Fehlingsche Lösung schwach. Es wurden darauf nochmals 100 g Hefe dem Gärgut zugefügt. Nach weiteren 6 Stunden war kein Zucker mehr nachweisbar. Das Endvolumen war 1095 ccm, entsprechend 99,5 g Rohrzucker = 104,7 g Monosacchariden.

Die Alkoholbestimmung wurde mit 300 ccm Gärgut vorgenommen, und ergab 13,76 g, was 48,0% ausmachte.

Da ein blinder Versuch das theoretisch vorauszusehende Resultat gehabt hatte, daß das Methylenblau mit der siedenden Jodwasserstoffsäure reagiert, seine Anwesenheit also falsche Werte für Glycerin ergeben hätte, mußte für die Bestimmung dieses Körpers der Farbstoff aus dem Gärgut entfernt werden. Dies geschah durch Adsorption an Tierkohle, welche abfiltriert und quantitativ ausgewaschen wurde. Die resultierende klare Lösung wurde dann wie gewöhnlich analysiert. Es wurden in 100 ccm 0,3565 g Glycerin, gleich 3,8% gefunden. Schon der Alkoholertrag hatte gelehrt, daß das Methylenblau fast von keinem Einfluß auf die gewöhnliche Verteilung der Gärungsendprodukte war.

Versuchsreihe 16.

Als Alkalisator wurde schließlich noch Alanin angewendet (α-Aminopropionsäure $CH_3 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$). Das Alanin wird in größten Mengen vertragen.

Digitized by Google

50 Rohrzucker, 50 g d, l-Alanin, 50 g Oberhefe; Volumen: 500 ccm. Die Hefe hatte sich nach 36 Stunden abgesetzt. Die Fehlingsche Probe fiel positiv aus. Es wurden nun noch 50 g Hefe nachgegeben, wodurch die Vergärung in weiteren 6 Stunden zu Ende geführt wurde. Das Endvolumen war 545 ccm, entsprechend 52,1 g in 49,5 g umgesetzten Rohrzucker enthaltenen Hexosen. Das beim Eindampfen reichlich wiederzugewinnende Alanin zeigte weder in wässeriger noch in salzsaurer Lösung eine Drehung, auch nicht in Gegenwart des stark die Aktivität steigernden[1]) $CaCl_2$.

Für die Alkoholanalyse wurden 300 ccm Gärgut verarbeitet; sie ergab 13,13 g = 45,8% Sprit.

Die Glycerinbestimmung wurde in 75 ccm Gärgut vorgenommen. Es wurde gefunden 0,355 g Glycerin; das sind 4,9% des vergorenen Zuckers.

Zur Essigsäureermittelung dienten endlich 300 ccm Gärgut. Sie enthielten 0,732 g oder 2,5% der Hexosen an Essigsäure.

Die vorstehend beschriebenen Versuche tun in ihrer Gesamtheit dar, wie allgemein einfache anorganische (und organische) Verbindungen in den physiologischen Zuckerabbau eingreifen, indem sie diesen Vorgang überraschenderweise in qualitativer Hinsicht weitgehend abändern.

Neben allgemeinen biologischen Gesichtspunkten erhebt sich die experimentell zu prüfende Frage[2]), ob bei der bekannten, empirisch gefundenen Behandlung des Diabetes mit alkalischen Wässern entsprechende Beeinflussungen mit im Spiele sind.

---

[1]) P. Pfeiffer, B. 48, 1941. 1915.

[2]) s. a. C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 106, 281. 1920.

Digitized by Google

Berichtigung

zur Mitteilung von S. Partos „Über einen neuen hämatinartigen krystallisierten Körper".

Diese Zeitschr. **105**, 49. 1920.

An mehreren Stellen, wo als Reduktionsmittel Natriumhyposulfit erwähnt wird, ist Natriumhydrosulfit, $Na_2S_2O_4$, gemeint.

Digitized by Google

Muneo Kumagawa †.

Erst jetzt ist hierher die Mitteilung gelangt, daß Herr Professor Muneo Kumagawa in Tokio am 7. April 1918 verstorben ist. Der japanische Gelehrte, der 1858 in Fukushima geboren wurde, hat 1883 an der Universität in Tokio seine Studien beendet und sich in den Jahren 1884—1889 in Berlin unter der Leitung Ernst Salkowskis eine gründliche Sonderausbildung auf dem Gebiete der Biochemie erworben. 1891 wurde er zum ordentlichen Professor der physiologischen Chemie an der Universität in Tokio und 1917 zum Direktor der medizinischen Fakultät daselbst ernannt.

Der Heimgegangene hat die Wissenschaft mit einer Reihe wichtiger Ergebnisse gefördert, die sämtlich in deutscher Sprache publiziert sind. Erwähnt seien seine Arbeiten über die Wirkung antipyretischer Mittel auf den Proteinumsatz und seine Studien über den Eiweißbedarf; zu dieser Frage hat er durch vergleichende Untersuchungen über die Ernährung mit gemischter und rein vegetabilischer Kost wertvolle Beiträge geliefert. Mit Salkowski zusammen veröffentlichte er eine Studie über freie und gebundene Salzsäure im Magensaft. Seine Untersuchungen zur Frage der Entstehung von Fett aus Eiweißkörpern sowie weiter das von ihm verfolgte Problem der Zuckerbildung aus Fett sind wohl die Veranlassung zur Ausarbeitung seiner bekannten Methode zur Bestimmung von Lipoiden gewesen, die er zusammen mit K. Suto geschaffen und ausführlich in dieser Zeitschrift im Jahre 1908 beschrieben hat. Dieses Verfahren ist Gemeingut aller Biologen und Nahrungsmittelchemiker geworden ebenso wie seine Modifikation der Pavyschen Methode der Zuckeranalyse, die sich durch große Einfachheit auszeichnet und zersetzliche sowie teure Reagentien vermeidet.

Viele der jüngeren Biochemiker Japans verdanken dem ausgezeichneten Lehrer und Forscher Kumagawa ihre Ausbildung.

C. N.

Digitized by Google

Digitized by Google

Zur Theorie der Invertasewirkung.

Von
L. Michaelis und M. Rothstein.

(Eingegangen am 9. Juli 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Für den großen Einfluß, den die H-Ionen auf die Geschwindigkeit der Fermentprozesse ganz besonders nach den grundlegenden Versuchen von S. P. L. Sörensen[1]) haben, wurde in früheren Arbeiten aus unserem Laboratorium eine theoretische Deutung versucht[2]). Dieser Theorie liegt die Beobachtung zugrunde, daß bei der Invertase die Anfangsgeschwindigkeit der Fermentwirkung, als Funktion von p_H dargestellt, ganz allgemein gesprochen die Form einer Dissoziationskurve oder Dissoziationsrestkurve hat. Die auf Grund dieser Beobachtung entwickelte Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit der Invertase hat aber noch eine Lücke, die wir uns nunmehr auszufüllen bemühen wollen.

Der Theorie wurde die Annahme zugrunde gelegt, daß die Invertase eine Säure sei und daß die Geschwindigkeit ihrer Wirkung der Konzentration der undissoziierten Invertasemoleküle proportional sei. Unter dieser Annahme hat der Parameter jener Kurve die physikalische Bedeutung der Säuredissoziationskonstanten der Invertase.

In einer zweiten Arbeit[3]) wurde dann die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Zuckerkonzentration untersucht und gedeutet unter der Annahme, daß die Saccharose mit der Invertase eine Verbindung eingehe, welche spontan nach Art einer monomolekularen Reaktion in die Endprodukte des Prozesses zerfällt.

Nunmehr galt es, diese beiden Anschauungen unter einem gemeinsamen Gesichtspunkt zu vereinen. Denn in der ersten

[1]) S. P. L. Sörensen, diese Zeitschr. **21**, 131. 1909.

[2]) L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. **35**, 386. 1911.

[3]) L. Michaelis und Miß Menton, diese Zeitschr. **49**, 333. 1913.

Digitized by Google

Arbeit hatten wir noch keinerlei Vorstellung über den Mechanismus der Fermentwirkung zugrunde gelegt. Wenn wir nun auf Grund der zweiten Arbeit annehmen, daß Invertase und Zucker eine Verbindung bilden, so verliert der Parameter der Invertase-p_H-Kurve seine Bedeutung als Dissoziationskonstante k der Invertase. Dies wurde in einer weiteren Arbeit[1]) theoretisch entwickelt und es wurde abgeleitet, daß der graphisch ermittelte Parameter q unter dieser Annahme die Bedeutung hat $q = \frac{k}{1 + a \cdot S}$, wo k die Säuredissoziationskonstante der Invertase, a die Affinitätskonstante der Saccharose-Invertaseverbindung = 60 und S die Konzentration der Saccharose ist. Der Parameter q mußte somit eine Funktion der Konzentration der Saccharose (S) sein, wenn die ganze Vorstellung richtig war. Dies wird in der vorliegenden Arbeit experimentell geprüft.

Der experimentelle Teil zeigt nun aber, daß der Parameter q unabhängig ist von der Zuckerkonzentration. Wenn wir eine Versuchsreihe ansetzen mit konstanter Zuckerkonzentration und wechselndem p_H und die für ein beliebiges p_H beobachtete Wirkungsgeschwindigkeit ausdrücken in Bruchteilen der bei gleicher Zucker- und Fermentkonzentration und optimalem p_H herrschenden Geschwindigkeit oder mit anderen Worten als Bruchteil der für die gegebene Ferment- und Zuckerkonzentration maximal erreichbaren Geschwindigkeit, so erhalten wir eine Kurve von der allgemeinen Form einer Dissoziationskurve mit einem ganz bestimmten Parameter. Nach der in der letzten Arbeit entwickelten Theorie hätte dieser Parameter, wenn die Zuckerkonzentration in den einzelnen Versuchsreihen von 1% bis 15%, d. h. von 0,0294 molar bis 0,438 molar variiert wurde, von $1{,}1 \cdot 10^{-7}$ bis $0{,}110 \cdot 10^{-7}$, also fast genau um das 10fache des Wertes, oder der log der Konstanten q von 6,96 bis 7,96, also um den Betrag 1,0[2]) sich ändern müssen. Diese Änderung liegt weit

[1]) L. Michaelis, diese Zeitschr. **60**, 91. 1914.

[2]) H. v. Euler und Laurin, Zeitschr. f. physiol. Chemie **110**, 55, 1920, haben neuerdings die Konstante a nach unserer Methode nochmals bestimmt und einen der Größenordnung nach ähnlichen, aber nicht völlig identischen Wert gefunden (38,5 statt 60). Legen wir diesen Wert der Berechnung zugrunde, so würden sich die logarithmischen Parameter um 0,9 statt 1,0 unterscheiden müssen. Das macht für die weiteren Betrachtungen nichts aus.

Digitized by Google

außerhalb der Fehlergrenzen. Es zeigt sich aber im Versuch nichts von dieser Änderung: der Parameter bleibt immer der gleiche, welche Zuckerkonzentration wir auch im Versuch anwenden.

In Abb. 1 sind die mit verschiedenen Zuckerkonzentrationen ausgeführten Versuchsreihen dargestellt. Die mit derselben Zuckerkonzentration angestellten Versuche sind mit dem gleichen Zeichen versehen. Alle Punkte aus den Versuchen mit den verschiedenen Zuckerkonzentrationen lassen sich ohne Zwang auf eine einzige Dissoziationskurve unterbringen mit dem (logarithmischen) Parameter 6,50 bei 24,5°. In der ersten Arbeit wurde er = 6,70 bei 22° gefunden, eine Abweichung, die wohl innerhalb der Versuchsfehler liegen dürfte. In der Bewertung der Zahlen geben wir dem jetzigen Befund infolge der größeren Erfahrung in der Technik den Vorzug.

Was die Genauigkeit der einzelnen Punkte betrifft, so lehrt ein Blick auf die Zeichnung, daß in Anbetracht der aus den Optimumversuchen (p_H 3,7 bis 4,5) ersichtlichen Fehlerbreite die Übereinstimmung mit der Dissoziationskurve so gut ist, wie erwartet werden kann. Zum mindesten in recht guter Annäherung gibt die nach der Theorie gezeichnete Kurve den wahren Verlauf wieder. Andererseits ist nicht zu leugnen, daß eine weitere Herabdrückung der Fehlergrenzen erwünscht wäre, um festzustellen, wie groß die Genauigkeit ist, mit der die Dissoziationskurve und die Geschwindigkeits-p_H-Kurve wirklich übereinstimmen. Jedenfalls könnte es sich, wenn überhaupt, nur um geringfügigste Abweichungen handeln, welche keinen Anlaß geben können, die Grundzüge der Theorie zu verändern. Es wäre z. B. denkbar, daß die unserer Theorie zugrunde liegende Annahme von dem vollkommenen molekulardispersen Zustand des Ferments nur angenähert zutrifft, woraus leichte Veränderungen im Verlauf der Kurve sich erklären würden[1]), ohne daß die Grundanschauung über das Wesen der Wirkung der H-Ionen geändert zu werden braucht. Es soll unsere zukünftige Aufgabe sein, diesen Punkt eingehender zu erforschen; für unser heutiges Problem, die Verschiebung des Parameters mit der Änderung der Zuckerkonzentration, genügt aber das jetzige Material.

---

[1]) L. Michaelis, diese Zeitschr. **106**, 83. 1920.

Digitized by Google

Nach der Theorie hätten nämlich die beiden den äußersten Zuckerkonzentrationen entsprechenden Dissoziationskurven, wie sich aus den oben angeführten Zahlen ergibt, um praktisch genau eine ganze Abscisseneinheit horizontal verschoben sein müssen (Kurve V in Abb. 1). Es zeigt sich aber, daß die erwartete Änderung des Parameters mit der Zuckerkonzentration nicht eintritt. Folglich muß unsere ursprüngliche Annahme einen Fehler enthalten, und wir müssen versuchen, ob sich eine Annahme finden läßt, mit der sich diese Konstanz des Parameters vereinigen läßt. Eine solche läßt sich nun in der Tat leicht finden. Sie hat sogar noch den Vorzug vor der ursprünglichen, daß sie die gesuchte Gedankenbrücke zwischen der ersten Arbeit und der zweiten viel besser schlägt und die Rolle der Enzym-Substratverbindung, welche in der ersten Arbeit etwas zu kurz gekommen ist, viel besser hervortreten läßt.

Die Annahme, welche die gesamten Erscheinungen nunmehr einheitlich zum Verständnis bringt, ergibt sich durch eine ganz leichte Modifikation der ursprünglichen. Wir stellen beide Auffassungen nebeneinander.

Ältere Auffassung:

Invertase ist eine Säure. Ihre undissoziierten Moleküle verbinden sich mit Zucker zu einer Verbindung, welche monomolekular spontan zerfällt. Der Parameter der Geschwindigkeits-p_H-Kurve hat die Bedeutung $q = \frac{k}{1 + a \cdot S}$.

Neuere Auffassung:

Invertase verbindet sich mit Saccharose zu einer Verbindung, welche eine Säure ist. Die undissoziierten Moleküle dieser Säure zerfallen spontan in monomolekularer Reaktion. Der Parameter der Geschwindigkeits-p_H-Kurve ist die Säuredissoziationskonstante dieser Saccharose-Invertaseverbindung.

Ob die „freie" Invertase selbst eine Säure ist, ist bei der neueren Auffassung zunächst offen gelassen. Es ist allerdings in Erwägung der schon früher von uns gefundenen Tatsachen, nämlich daß Invertase von Eisenoxyd oder Tonerde, aber nicht von Kaolin adsorbiert wird und daß sie selbst bei saurer Reaktion noch anodisch wandert, wahrscheinlich, daß auch die „freie" Invertase eine Säure ist. Jedoch muß man in der Deu-

Digitized by Google

tung dieser Befunde vorsichtig sein, da wir keinen Beweis dafür haben, daß in unserer zuckerfreien Fermentlösung die Invertase in „freiem" Zustand vorhanden ist. Es ist denkbar, daß die Eigenschaften, die scheinbar die „freie" Invertase charakterisieren sollen, sich auf irgendeine Verbindung des eigentlichen Ferments mit irgendeinem sauren Körper, sagen wir etwa Nucleinsäure, beziehen. So haben Pekelharing und Ringer[1]) gezeigt, daß die Befunde über die elektrische Ladung und Umladung von Pepsin, welche Michaelis und Davidsohn[2]) machten, nicht auf freies Pepsin, sondern auf eine Pepsin-Peptonverbindung zu beziehen sind. Pekelharing und Ringer zeigten, daß ein nach der Pekelharingschen Methode aus Hundemagensaft dargestelltes Pepsin anodisch wandert und sich auch bei sehr saurer Reaktion nicht umladen läßt. Sie meinten ursprünglich, daß sie nunmehr die Eigenschaften des reinen Pepsins gefunden hätten. Ringer läßt aber in einer späteren Arbeit[3]) selbst noch die Möglichkeit offen, daß selbst das Pekelharingsche Pepsin „eine Verbindung ist von einem eiweißartigen Körper mit dem eigentlichen Enzym" Es folgt eigentlich daraus nur, daß wir über die physiko-chemische Beschaffenheit des „reinen" Ferments überhaupt noch nichts Gewisses aussagen können. Unsere jetzigen Versuche berechtigen nur zu dem Schluß, daß die Verbindung der Invertase mit Saccharose eine Säure ist und weiterhin, daß diese Säure unter den Bedingungen unseres Versuchs in molekular-disperser Form gelöst ist. Denn die Dissoziationskurve dieser Verbindung ist nur die einer molekular-dispersen Säure und zeigt innerhalb der bisher erreichbaren Genauigkeitsgrenzen keine von den Abweichungen, welche nach den theoretischen Untersuchungen von L. Michaelis[4]) bei einer kolloidalen Säure zu erwarten wären.

Ferner stehen mit dieser Auffassung nun auch die Beobachtungen von Abderhalden und Fodor[5]) in Einklang, welche gezeigt haben, daß bei der Wirkung der Endotryptase der Hefe

[1]) C. A. Pekelharing und W. E. Ringer, Zeitschr. f. physiol. Chemie **75**, 282. 1911

[2]) L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. **28**, 1. 1910. Die Beobachtung ist neuerdings von Northrup (Journ. of gen. Physiol. **2**, 465. 1920) bestätigt worden.

[3]) W. E. Ringer, Zeitschr. f. physiol. Chemie **95**, 212.

[4]) L. Michaelis, diese Zeitschr., **106**, 225. 1920

[5]) E. Abderhalden und Fodor, Fermentforschung **1**, 533. 1916.

Digitized by Google

auf verschiedene Polypeptide das p_H-Optimum je nach dem angewandten Polypeptid ein anderes sei. Unter der zwar noch nicht bewiesenen, aber doch sehr möglichen Voraussetzung, daß das Hefeferment, welches all diese verschiedenen Polypeptide angreift, einheitlich ist, würde auch aus diesen Beobachtungen hervorgehen, daß die Wirkung der H-Ionen sich nicht allein auf das Ferment, sondern auch auf die Ferment-Substratverbindung bezieht. Es ist durchaus möglich, daß die saure Natur dieser Ferment-Substratverbindung je nach der Art des angewandten Polypeptids verschieden ist und daher auch das p_H-Optimum für jedes Substrat ein anderes ist. Es geht aber nicht, wie Abderhalden und Fodor meinen, daraus hervor, daß die Dissoziationstheorie zur Erklärung der p_H-Wirkung prinzipiell falsch sei; es geht nicht daraus hervor, daß die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes prinzipiell unrichtig sei und daß die Ferment-Substratverbindung sich unter allen Umständen wie ein hochkolloidaler Körper verhalten muß. Dies kann natürlich so sein, und es ist gewiß zum mindesten in allen den Fällen, bei denen schon das Substrat eine hochkolloidale Beschaffenheit hat, wie denaturiertes Eiweiß, Stärke u. a., nicht zu bezweifeln, daß die Gesetze der Dissoziation in molekular-dispersen Lösungen nicht unverändert anwendbar sind. Aber wir glauben gerade an der Invertase gezeigt zu haben, daß bei Fermentprozessen die Kolloidität nicht nur des Substrats, sondern auch der Substrat-Fermentverbindung nicht unbedingt immer vorhanden sein muß. Das ist insofern von Bedeutung, als zur Erklärung der Fermentwirkung, insbesondere aber der Wirkung der hydrolysierenden Fermente kolloidchemische Gesichtspunkte nicht zur Grundlage gemacht zu werden brauchen, und für die Erforschung der allgemeinen Fermentlehre ist es daher nützlich, sich zunächst an diejenigen Fermente zu halten, bei denen etwaige, durch die Kolloidität von Substrat oder Ferment geschaffenen Komplikationen möglichst vermieden werden. In dieser Hinsicht halten wir die Invertase für das geeignetste Ferment.

Über den Verlauf des bei stark saurer Reaktion wieder absteigenden Schenkels haben wir weitere Untersuchungen nicht angestellt. In der früheren Arbeit wurde schon auseinander gesetzt, weshalb exakte Messungen in diesem p_H-Gebiet überhaupt nicht ausführbar sind. Es liegt daran, daß in diesem Gebiet nicht nur die Wirkung des Ferments geschwächt, sondern daß

Digitized by Google

gleichzeitig das Ferment in irreversibler Weise zerstört wird. Unsere frühere Deutung des absteigenden Schenkels war die, daß die Invertase nicht nur eine Säure, sondern bei stärker saurer Reaktion auch eine Base sei und daß die Kationen des Ferments erstens fermentativ unwirksam und zweitens eine spontane irreversible Änderung durchmachten.

Diese Deutung ist auch jetzt noch durchaus möglich. Jedoch bedarf dieser Punkt einer besonderen Bearbeitung. Wir möchten aber schon hier darauf hinweisen, daß bei dem heutigen Stand der Auffassung auch noch eine andere Deutung zulässig ist.

Unsere jetzige Annahme ließe sich durch die chemische Gleichung ausdrücken:

1 Mol freie Invertase + 1 Mol Saccharose $\rightleftharpoons$ 1 Mol Saccharose-Invertase-Säure Wenn wir auf diese Gleichung das Massenwirkungsgesetz anwenden, so machen wir stillschweigend die Voraussetzung, daß die freie Invertase nur in einer einzigen Form vorhanden ist, d. h. daß sie entweder eine so **starke** Säure ist, daß sie innerhalb des Bereichs, in dem unsere Versuche sich abspielen (von $p_H = 10{,}0$ bis etwa $p_H = 3{,}5$), praktisch immer total dissoziiert ist, also praktisch nur als Anion auftritt; oder aber daß die freie Invertase eine so **schwache** Säure ist, daß sie innerhalb dieses p_H-Bereichs praktisch überhaupt nicht dissoziiert ist und, wenn überhaupt, erst bei noch höherer Alkalität Anionen zu bilden beginnt. Jedenfalls ist es nicht denkbar, daß sie eine Säure von derartiger Konstante sei, daß sie innerhalb des untersuchten p_H-Bereiches ihren Dissoziationszustand merklich änderte.

Sollte sich nun herausstellen, daß die freie Invertase eine äußerst schwache Säure ist, so wäre der bei stark saurer Reaktion absteigende Schenkel unserer Kurve bisher durch keine andere Annahme zu erklären als durch die obige, nämlich durch die Annahme ihrer amphoteren Natur. Sollte es sich aber herausstellen, daß die Invertase eine sehr **starke** Säure ist, so kann man ihr Verhalten bei saurer Reaktion dadurch erklären, daß bei einer solchen ($p_H < 3{,}5$) die Dissoziation der freien Invertase (und damit vielleicht auch gleichzeitig ihre Dispersität) herabgedrückt zu werden beginnt. In diesem Falle wäre die Invertase-Saccharose-Verbindung eine schwächere Säure als die freie Invertase, im ersteren Falle wäre sie eine stärkere Säure. Der Umstand, daß bei den Überführungsversuchen Invertase auch bei saurer Reaktion anodisch wandert, würde dafür sprechen, daß sie eine sehr **starke** Säure ist. In dem ersten Fall würde also die Säurenatur des Ferments durch die Bindung an die Saccharose verstärkt werden, wie etwa die saure Natur der Borsäure durch Bindung an einen Zucker erhöht wird. Im zweiten Falle würde die saure Natur der Invertase durch Bindung an Saccharose herabgesetzt werden, etwa so wie die Acidität der Phosphorsäure durch eine esterartige Verbindung mit einem Zucker vermindert wird. Um die Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten zu treffen, sind aber noch weitere Untersuchungen erforderlich.

Digitized by Google

Versuche.

Die Invertase wurde in folgender Weise hergestellt. Bäckerhefe wurde mit dem doppelten Volumen Wasser und etwas Chloroform 2 Tage im Brutschrank digeriert, dann mit Essigsäure angesäuert, mit Kaolin durchgeschüttelt und filtriert. Die Lösung wurde in einigen Versuchsreihen unmittelbar so benutzt, in anderen erst, nachdem durch 1—2tägiges Dialysieren die Essigsäure zum größten Teil entfernt war. Alle Versuche wurden im Wasserbad von 24,5° ± 0,1° ausgeführt; die Versuchsanordnung war ganz ähnlich wie in der früheren Arbeit. Puffer: Phosphat-, Acetat-, Glykokollgemische. Die Zusammensetzung der Puffer wurde so eingerichtet, daß ihre Konzentration nur selten bis 0,1 normal an Kationen stieg und meist weit darunter blieb, so daß wir von der Salzwirkung der Puffergemische praktisch absehen können.

Zwar geht aus neueren Untersuchungen von Fales und Nelson[1]) hervor, daß die Wirkung von Salzen auf die fermentative Zuckerspaltung nicht unter allen Umständen zu vernachlässigen ist. Diese Autoren fanden, daß im p_H-Optimum zwar eine hemmende Wirkung von NaCl sich erst in sehr hohen Konzentrationen (2fach normal) bemerkbar macht, daß dagegen bei $p_H <$ oder $>$ als p_H-Optimum schon geringere NaCl-Konzentrationen hemmend wirken. Für diejenigen Salzmengen, welche in unsern Pufferlösungen enthalten sind, dürfte aber diese hemmende Wirkung auf alle Fälle sehr klein sein, wenn man die hemmende Wirkung der Phosphatsalze etwa ebenso groß annimmt, wie sie die Autoren für NaCl fanden. Wir glauben daher, keinen praktisch bemerkbaren Fehler zu begehen, wenn wir von der „Salzwirkung" unserer Puffer absehen. Es handelt sich hierbei offenbar um ähnliche Salzwirkung wie bei den „Salzfehlern" der Indikatoren, über deren Theorie und Praxis kürzlich in unserm Laboratorium Untersuchungen gemacht worden sind[2]). Die Analogie geht sogar, soviel man aus dem Material von Fales und Nelson schließen kann, so weit, daß in beiden Fällen die Salzwirkung in einer Horizontalverschiebung der Dissociationskurve besteht, so daß ein Einfluß der Salze auf den Verlauf der Kurve nur in ihrem mittleren Teil bemerkbar ist, während bei Annäherung an das Maximum ($\varrho = 1$) und an das Minimum ($\varrho = 0$) der Einfluß der Salze auf den Verlauf der Kurve verschwindet.

Die Unterbrechung der Fermentwirkung geschah dadurch, daß je 10 ccm des Versuchsgemisches mit 2 ccm gesättigter Sodalösung versetzt wurden. Bei allen Versuchsreihen von 15% bis herab zu 2% Zuckerkonzentration legten wir der Berechnung

[1]) Fales und Nelson, Journ. Amer. Chem. Soc. **37**, 2769. 1915.
[2]) Michaelis und Gyement, diese Zeitschr. **109**, 165. 1920.

Fortsetzung auf S. 230.

Digitized by Google

Tabelle I. Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 15% = 0,438 molar.

t = Zeit in Minuten. a—x Drehung zur Zeit t in Graden; gemessen in einem 18,94 cm langen Rohr, umgerechnet auf die Konzentration vor Zufügung der Sodalösung. x Drehungsabnahme.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	a—x	x	$x/t = v$	x/t Mittel ber. auf 5ccm Ferment	v_{max}	v/v_{max} Relat. Umsatzgeschw.
1	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 5 ccm Wasser 10 ccm Ferment 5 ccm	3,62	0 10 20	15,10 13,79 12,50	1,31 2,60	0,131 0,130	0,131	0,137	0,956
2	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 4 ccm n/1-Na-Acetat 1 ccm Wasser 10 ccm Ferment 5 ccm	4,07	0 9 20	15,276 14,100 12,530	1,176 2,746	0,1306 0,1373	0,134		0,978
3	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 4 ccm n/1-Na-Acetat 1 ccm Wasser 10 ccm Ferment 5 ccm	4,12	0 11 20	15,79 14,14 12,88	1,65 2,91	0,150 0,145	0,148		1,08
4	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Na-Acetat 2 ccm n/1-Essigsäure 2 ccm Wasser 11 ccm Ferment 5 ccm	4,57	0 10 20	15,10 13,76 12,44	1,34 2,66	0,134 0,133	0,134		0,978
5	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Na-Acetat 2 ccm Wasser 13 ccm Ferment 5 ccm	5,33	0 11 22	15,09 13,70 12,48	1,39 2,61	0,1260 0,1186	0,1235		0,901
6	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm m/15 sek. Phosph. 6 ccm m/15 prim. „ 4 ccm Wasser 5 ccm Ferment 5 ccm	5,95	0 25 41,5	15,44 12,94 11,28	2,50 4,16	0,100 0,100	0,100		0,730
7	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm m/15 prim. Phosph. 3 ccm Wasser 9 ccm Ferment 5 ccm	6,71	0 30 51	15,29 13,99 12,24	1,30 3,05	[0,0433] 0,0598	0,0598		0,437
8	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm m/15 prim. Phosph. 1 ccm Wasser 11 ccm Ferment 5 ccm	6,84	0 47 60	15,24 12,77 12,13	2,47 3,11	0,0525 0,0518	0,0523		0,382
9	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 4 ccm Wasser 11 ccm Ferment 5 ccm	7,23	0 53 63	15,06 13,79 13,21	1,27 1,85	0,0240 0,0294	0,0267		0,195
10	30 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 6 ccm Wasser 9 ccm Ferment 5 ccm	7,38	0 42 52	15,30 14,34 14,25	0,96 1,05	0,0228 0,0202	0,0219		0,160

Digitized by Google

Tabelle II.

Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 10 % = 0,29 molar.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t	x/t Mittel ber. a. 2,5 ccm Ferment	v_{max}	v/v_{max} Relat. Umsatzgeschw.
1	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm Standardacetat 5 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,50	0 15 25	11,27 10,62 10,21	0,65 1,06	0,0433 0,0424	0,0429	0,0422	1,017
2	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm Standardacetat 5 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,51	0 20 41	10,94 10,20 9,28	0,74 1,66	0,0370 0,0405	0,0388		0,920
3	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm Standardacetat 5 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,54	0 30 45	11,00 9,62 9,01	1,38 1,99	0,046 0,044	0,045		1,066
4	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Na-Acetat 5 ccm n/1-Essigsäure 0,5 ccm Wasser 12 ccm Ferment 2,5 ccm	5,46	0 20 40	11,07 10,37 9,54	0,70 1,53	0,0350 0,0382	0,0365		0,865
5	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Na-Acetat 5 ccm n/1-Essigsäure 0,5 ccm Wasser 12 ccm Ferment 2,5 ccm	5,46	0 20 40	11,04 10,33 9,64	0,71 1,40	0,0355 0,0350	0,0353		0,836
6	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm m/15 sek. Phosph. 6 ccm m/15 prim. „ 4 ccm Wasser 5 ccm Ferment 5 ccm	5,85	0 15 30	11,09 10,13 9,19	0,96 1,90	0,064 0,0633	0,0318		0,758
7	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Na-Acetat 5 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	6,01	0 20 40	11,20 10,60 9,996	0,60 1,204	0,0300 0,0301	0,030		0,713
8	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm m/15 sek. Phosph. 7 ccm m/15 prim. „ 3 ccm Wasser 5 ccm Ferment 5 ccm	6,11	0 20 40	11,11 9,96 8,84	1,15 2,27	0,0575 0,0567	0,0285		0,677
9	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm m/15 sek. Phosph. 8 ccm m/15 prim. „ 2 ccm Wasser 5 ccm Ferment 5 ccm	6,37	0 22 40	11,56 10,46 9,58	1,10 1,98	0,0550 0,0495	0,026		0,618
10	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm m/15 prim. Phosph. 5 ccm Wasser 7 ccm Ferment 5 ccm	6,77	0 26 40	11,448 10,668 10,176	0,780 1,272	0,0300 0,0318	0,0155		0,368

Digitized by Google

Tabelle II (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t	x/t Mittel ber. a. 2,5 ccm Ferment	v_{max}	v/v_{max} Relat. Umsatzgeschw.
11	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm $^m/_{15}$ prim. Phosph. 3 ccm Wasser 9 ccm Ferment 5 ccm	6,82	0 25 45	11,35 10,68 9,94	0,67 1,41	0,0268 0,0313	0,0145		0,344
12	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm $^m/_{15}$ prim. Phosph. 2,5 ccm Wasser 9,5 ccm Ferment 5 ccm	6,89	0 31 53	11,34 10,62 10,00	0,72 1,34	0,0232 0,0247	0,0120		0,284
13	20 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,4 n-Glykokoll 3,3 ccm 0,18 n-NaOH 6,7 ccm Wasser 1 ccm Ferment 9 ccm	9,23	0 231	11,04 10,92	0,12	0,00052	0,00026		0,00061

Tabelle III.

Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 5% = 0,146 molar.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t ber. auf 10 ccm Ferment	x/t Mittel	v_{max}	v/v_{max}
1	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm $^n/_1$-Essigsäure 5 ccm $^n/_1$-Na-Acetat 1 ccm Wasser 21,5 ccm Ferment 2,5 ccm	3,98	0 10 15	5,940 5,196 4,840	0,754 1,100	0,3016 0,2932	0,2974	0,280	1,056
2	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm $^n/_1$-Essigsäure 3 ccm $^n/_1$-Na-Acetat 2 ccm Wasser 22,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,42	0 10,25 15,4	5,78 5,10 4,78	0,68 1,00	0,266 0,260	0,2628		0,938
3	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm $^m/_{15}$-sek. Phosph. 3 ccm $^m/_{15}$ prim. „ 7 ccm Wasser 17,5 ccm Ferment 2,5 ccm	5,85	0 15 20,25	5,850 5,010 4,750	0,840 1,100	0,224 0,220	0,222		0,796
4	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm $^m/_{15}$ sek. Phosph. 3 ccm $^m/_{15}$ prim. „ 7 ccm Wasser 17,5 ccm Ferment 2,5 ccm	6,00	0 10 15	5,69 5,22 4,93	0,47 0,76	0,188 0,203	0,196		0,700

Digitized by Google

Tabelle III (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t ber. auf 10 ccm Ferment	x/t Mittel	v_{max}	v/v_{max}
5	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm	6,91	0	5,850					
	0,36 mol. sek. Ph. 2 ccm		15	5,450	0,400	0,1066	0,1063		0,381
	$^n/_{15}$ prim. Phosph. 3 ccm		20,2	5,320	0,530	0,1058			
	Wasser 22,5 ccm								
	Ferment 2,5 ccm								
6	20 pr. Zuckerlsg. 12,5 ccm	8,16	0	5,538					
	0,2 n-Glykokoll 12,5 ccm		85	4,570	0,968	0,01138	0,01178		0,042
	0,18 n-NaOH 7,5 ccm		148	3,735	1,803	0,01218			
	Wasser 5 ccm								
	Ferment 12,5 ccm								
7	20 pr. Zuckerlsg. 10 ccm	8,78	0	5,640					
	0,6 n-Glykokoll 10 ccm		120	5,016	0,624	0,0052	0,0053		0,0189
	0,18 n-NaOH 10 ccm		145	4,830	0,810	0,0054			
	Ferment 10 ccm								
8	20 pr. Zuckerlsg. 12,5 ccm	9,01	0	5,54					
	0,2 n-Glykokoll 12,5 ccm		85,5	5,29	0,25	0,00292	0,0031		0,01106
	0,18 n-NaOH 12,5 ccm		150	5,05	0,49	0,00327			
	Ferment 12,5 ccm								
9	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm	9,61	0	5,42					
	0,2 n-Glykokoll 5 ccm		70	5,26	0,16	0,00228	0,00226		0,0081
	0,18 n-NaOH 15 ccm		98	5,20	0,22	0,00224			
	Ferment 10 ccm								
10	20 proz. Zuckerlsg. 10 ccm	10,01	0	5,12					
	Soda 8 ccm		120	5,12	0				0
	Wasser 12 ccm								
	Ferment 10 ccm								

Tabelle IIIa.

Zweite Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 5% = 0,146 molar.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t	$x/t_{umgest.}$	v/v_{max}
1	10 proz. Zuckerlsg. 30 ccm	7,15	0	6,15				
	$^m/_{15}$ sek. Phosph. 10 ccm		67,5	4,76	1,39	0,0206	0,0077	0,182
	Wasser 10 ccm		105	4,16	1,99	0,0189		
	Ferment 10 ccm		174	2,95	3,20	0,0184		
2	10 proz. Zuckerlsg. 30 ccm	7,30	0	6,12				
	$^m/_{15}$ sek. Phosph. 15 ccm		82	4,88	1,24	0,0151	0,0056	0,118
	Wasser 5 ccm		120	4,33	1,79	0,0149		
	Ferment 10 ccm							
3	10 proz. Zuckerlsg. 30 ccm	9,39						
	0,4 n-Glykokoll 5 ccm		0	6,29				
	0,8 n-NaOH 12 ccm		72	6,25	0,04	0,0005	0	0
	Wasser 3 ccm		120	6,24	0,05	0,0004		
	Ferment 10 ccm							

Digitized by Google

Tabelle IV.

Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 2% = 0,058 molar.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x/t ber. auf 2,5 ccm Ferm.	x/t ber. auf 5 ccm Ferm.	x/t Mittel	v_{max}	v/v_{max}
1	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 3 ccm n/1-Na-Acetat 2 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	3,71	0	2,41						
			9	1,89	0,62	0,0689	0,1378	0,1296		1,055
			15	1,56	0,85	0,0566	0,1132			
2	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 4 ccm n/1-Na-Acetat 1 ccm Wasser 12,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,19	0	2,390						
			10	1,727	0,663	0,0663	0,1326	0,1281	0,123	1,04
			20	1,200	1,190	0,0595	0,1190			
3	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm n/1-Essigsäure 2 ccm n/1-Na-Acetat 2 ccm Wasser 13,5 ccm Ferment 2,5 ccm	4,58	0	2,435						
			20	1,320	1,115	0,0558	0,1116	0,1112		0,903
			25,5	1,020	1,415	0,0552	0,1104			
4	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm m/15 sek. Phosph. 2 ccm m/15 prim. Phosph. 8 ccm Wasser 7,5 ccm Ferment 2,5 ccm	5,61	0	2,420						
			20	1,374	1,054	0,0527	0,1054	0,1035		0,842
			26	1,127	1,293	0,0497	0,0994			
5	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 2 ccm m/15 prim. Phosph. 3 ccm Wasser 10 ccm Ferment 5 ccm	6,81	0	2,47						
			10	2,00	0,47	0,0235	0,047	0,046		0,374
			18	1,66	0,81	0,0225	0,045			
6	4 proz. Zuckerlsg. 20 ccm 0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm m/11 prim. Phosphor 3 ccm Wasser 9 ccm Ferment 5 ccm	6,92	0	2,49						
			15	1,87	0,62	0,0207	0,0413	0,0421		0,342
			30	1,205	1,285	0,0214	0,0428			

Tabelle V.

Versuchsreihe mit einer Zuckerkonzentration von 1% = 0,029 molar.

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x umger. auf d. Fermentmenge des Versuchs I	Zeit (in Min.), nach der eine Drehungsabn. von 0,55° nach graph Interpolation erreicht ist	Mittl. relative Umsatzgeschwindigk.
1	**2 proz. Zuckerlsg. 40 ccm** **Standardacetat 10 ccm** **Wasser 25 ccm** **Ferment 5 ccm**	4,50	0	1,453				
			7,5	1,237	0,226	0,226		
			16	0,978	0,475	0,475		
			24,5	0,768	0,685	0,685	19	(1)
			39,5	0,456	0,997	0,997		
			52,5	0,204	1,149	1,149		

Digitized by Google

Tabelle V (Fortsetzung).

Nr.	Zusammensetzung der Lösung	p_H	t	$a-x$	x	x umger. auf d. Fermentmenge des Versuchs I	Zeit (in Min.), nach der eine Drehungsabn. von 0,55° nach graph. Interpolation erreicht ist	Mittl. relative Umsatzgeschwindigk.
2	2 proz. Zuckerlsg. 30 ccm		0	1,500				
	$^m/_{15}$ sek. Phosph. 8 ccm		8	1,150	0,350	0,175		
	$^m/_{15}$ prim. Phosph. 2 ccm	5,76	16	0,792	0,708	0,354	26	0,731
	Wasser 12,5 ccm		32	0,240	1,260	0,630		
	Ferment 7,5 ccm		47	0,048	1,452	0,726		
3	2 proz. Zuckerlsg. 30 ccm		0	1,560				
	0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm		10	1,188	0,372	0,186		
	$^m/_{15}$ prim. Phosph. 5 ccm	6,66	22	0,812	0,748	0,374	41	0,442
	Wasser 14,5 ccm		32	0,648	0,812	0,456		
	Ferment 7,5 ccm		45	0,384	1,176	0,588		
4	2 proz. Zuckerlsg. 30 ccm		0	1,450				
	0,36 mol. sek. Ph. 3 ccm		10	1,100	0,350	0,175		
	$^m/_{15}$ prim. Phosph. 3 ccm	6,73	30,25	0,624	0,826	0,413	47,5	0,388
	Wasser 16,5 ccm		40	0,444	1,006	0,503		
	Ferment 7,5 ccm							

der Anfangsgeschwindigkeit die Tatsache zugrunde[1]), daß etwa bis zu $^1/_5$ des theoretisch erreichbaren Umsatzes der Umsatz praktisch als lineare Funktion der Zeit zu betrachten ist. Zunächst wurde für eine gegebene Zuckerkonzentration bei einem p_H von 3,7—4,5 (dem Optimum) in mehreren Parallelversuchen die Anfangsgeschwindigkeit ermittelt und der Mittelwert als die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zugrunde gelegt. Sodann wurden bei anderem p_H Bestimmungen der Geschwindigkeit ausgeführt und die Geschwindigkeit als Bruchteil der maximalen berechnet. Für die niederste Zuckerkonzentration, wo der anfängliche, als linear zu betrachtende Umsatz so klein wäre, daß die Versuchsfehler auf die Genauigkeit der Zahlen zu großen Einfluß hätten, wurde genau dieselbe Methode angewandt, wie sie in der Arbeit von Michaelis und Davidsohn[2]) früher beschrieben wurde. Es wurde der Reaktionsablauf auf eine weite Strecke hin beobachtet und graphisch die Zeiten gleichen Umsatzes miteinander verglichen (Abb. 2). Der aus mehreren Einzelversuchen gefundene Wert dieses Zeitverhältnisses wurde als relative Umsatzgeschwindigkeit betrachtet. Die Ergebnisse aller Versuche sind gemeinschaftlich in Abb. 1 dargestellt.

[1]) Michaelis u. Menten c. l.

[2]) l. c.

Digitized by Google

In einigen Versuchen, in denen eine sehr kleine Umsatzgeschwindigkeit erwartet werden durfte, wurde mit größerer Fermentmenge als in dem entsprechenden Maximalversuch ge-

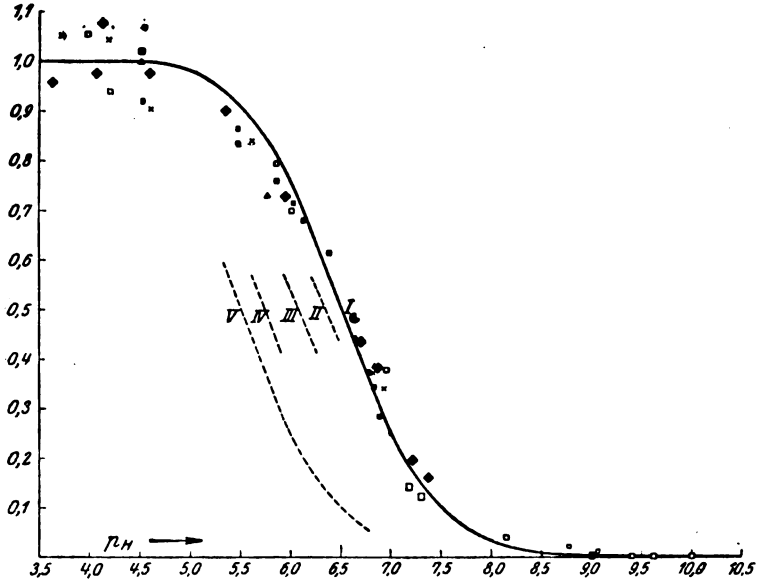


Abb. 1. Abszisse: p_H. Ordinate: relative Umsatzgeschwindigkeit. ◆ Versuche mit Zuckerkonzentration von 15% = 0,438 molar (Versuchsreihe I, vgl. Tab. I). ■ Versuche mit Zuckerkonzentration von 10% = 0,293 molar (Versuchsreihe II, vgl. Tab. II). □ Versuche mit Zuckerkonzentration von 5% = 0,146 molar (Versuchsreihe III, vgl. Tab. III u. III a). × Versuche mit Zuckerkonzentration von 2% = 0,058 molar (Versuchsreihe IV, vgl. Tab. IV). ▲ Versuche mit Zuckerkonzentration von 1% = 0,029 molar (Versuchsreihe V, vgl. Tab. V). Die ausgezeichnete Kurve ist eine berechnete Dissoziationsrestkurve von der Formel

$$\varrho = \frac{1}{1 + \frac{k}{h}}$$

wobei der Parameter k gesetzt ist $= 8{,}16 \cdot 10^{-7}$ oder $\lg k = -6{,}5$. h bedeutet die Wasserstoffzahl. Innerhalb jeder Versuchsreihe ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit = 1 gesetzt. Man sieht, daß in allen 5 Versuchsreihen die bei beliebigem p_H beobachtete relative Umsatzgeschwindigkeit innerhalb der Versuchsfehler sich dieser einen Dissoziationsrestkurve einfügt. Nach der älteren Auffassung wäre das nicht möglich. Diese hätte zu folgendem Ergebnis führen müssen. Nehmen wir die ausgezogene Kurve 1 als die für die höchste Zuckerkonzentration gegebene an, so hätten sich die einzelnen Punkte der Versuchsreihen II—V entsprechend den punktiert in ihrem mittlerern Abschnitt angedeuteten Dissoziationsrestkurven II—V einfügen müssen. Dies ist weit außerhalb aller Versuchsfehler nicht der Fall.

arbeitet und die Anfangswerte rechnerisch reduziert auf die ursprüngliche Fermentmenge unter Zugrundelegung der gesicherten Tatsache, daß die Anfangsgeschwindigkeit ceteris paribus der Fermentkonzentration proportional ist.

Digitized by Google

Was die erreichte Reproduzierbarkeit der Versuche betrifft, so geben uns über sie die einzelnen Versuche bei optimalem p_H (3,5—4,5) Aufschluß. Ihre Abweichungen vom Mittel sind hier nicht objektiv begründet, sondern stellen die Breite der Reproduzierbarkeit dar. Sie sind in der Regel mit $\pm$ 6 bis 7% des Mittelwertes zu veranschlagen. Hiernach können wir sagen, daß auch im übrigen Gebiet der Kurve unregelmäßige Schwankungen der beobachteten Einzelwerte von etwa $\pm$ 7% als wahrscheinliche Fehlergrenzen zu betrachten sind. Für 2 Gruppen von Versuchen muß man jedoch die Fehler noch höher anschlagen. Erstens für die allerniedersten Zuckerkonzentrationen. Hier machen die bloßen Ablesungsfehler schon viel aus. In Anbetracht dessen müssen die für diese Zuckerkonzentration beobachteten Punkte noch als recht befriedigend mit der Theorie übereinstimmend betrachtet werden. Zweitens sind die relativen Fehler im alkalischen Gebiet von $p_H > 8$ entschieden höher zu veranschlagen. Zunächst sind hier die Umsätze sehr klein. Das kann durch vergrößerte Fermentmengen und verlängerte Beobachtungszeiten zwar einigermaßen ausgeglichen werden. Ferner aber sind die Unsicherheiten der p_H-Messung hier viel größer. Wir befinden uns in einem Bereich, welcher sowohl für die Phosphat-, wie für die Glykokollgemische ein Gebiet schlechter Pufferung darstellt. (Man vergleiche das Sörensensche Diagramm der Puffer.) Boratpuffer, welche für dieses Gebiet besser wären, haben wir vermieden wegen der Bindungsfähigkeit der Borsäure an die Kohlehydrate und ihres dementsprechenden Einflusses auf die Drehung. Ferner ist der Temperatureinfluß auf p_H bei den Glykokollpuffern nicht zu vernachlässigen. Die Fermentwirkung geschah bei 24,5°, die p_H-Messung bei 17—21° C. Es kommt noch hinzu, daß ein kleiner

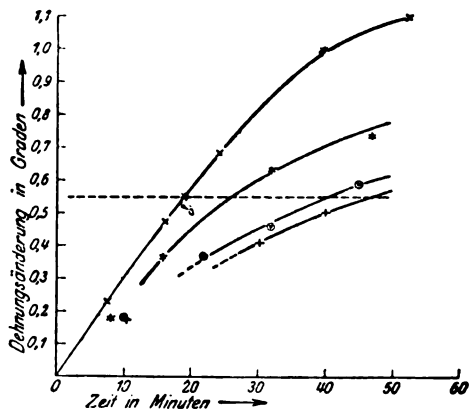


Abb. 2. Graphische Darstellung der Versuchsreihe V. Abszisse: Zeit (Minuten). Ordinate: Drehungsabnahme in Graden.

Digitized by Google

Gehalt der Fermentlösung an Carbonaten eine Unsicherheit der Wirkung des Puffers bedingen kann. Alles das bewirkt, daß in diesem alkalischen Gebiet die prozentische Abweichung der beobachteten und nach der Theorie berechneten Werte leicht größer sein kann. Wir glauben uns daher berechtigt, die in der Zeichnung zwar kaum auffallenden, aber prozentisch (rechnerisch) doch nicht zu vernachlässigenden Abweichungen auf nicht umgehbare Versuchsfehler beziehen zu dürfen. Betrachten wir nun die beobachteten Punkte im Vergleich zu der für die theoretische Dissoziationsrestkurve mit dem Parameter von 6,50, so finden wir nirgendwo eine Abweichung, welche sicher größer wäre als die zu erwartenden Fehler.

Ergebnis.

Wir können somit aus unseren früheren und diesen neuen Versuchen zusammen folgende Vorstellung von der Invertasewirkung als gegenwärtig bestes Bild entwerfen: Die Invertase, über deren Natur selbst noch nichts Bindendes ausgesagt werden soll, verbindet sich mit 1 Mol. Saccharose zu einer Verbindung, welche eine Säure von der Dissoziationskonstanten $3 \cdot 10^{-7}$ ist. Diese Säure befindet sich unter den von uns eingehaltenen Versuchsbedingungen (geringer Salzgehalt der Lösung, Abwesenheit sonstiger Stoffe, welche als kräftige Kolloidfällungsmittel wirken könnten) im Zustand der molekularen Dispersion und dissoziiert wie eine gewöhnliche echt gelöste Säure. Die undissoziierten Moleküle dieser Säure zerfallen spontan in die Produkte des enzymatischen Prozesses, die Anionen dagegen sind haltbar. Dies erklärt den Einfluß von p_H auf die Enzymwirkung zwischen p_H etwa $= 3{,}5$ bis ins alkalische Gebiet. Die Abnahme der Wirkung bei $p_H < 3{,}5$ läßt dagegen bis heute noch die Möglichkeit mehrerer Deutungen zu.

Digitized by Google

Über das Imidazolisopiperidin und seine Derivate.

Von

Sigmund Fränkel und **Karoline Zeimer.**

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 18. Juli 1920.)

Im hiesigen Laboratorium hat Julius Welisch[1]) durch Kondensation von Histidin mit Methylal und konzentrierter Salzsäure die Imidazolyltetrahydropyridincarbonsäure dargestellt. Diese Substanz war von um so größerem Interesse, als sie ein neues Ringsystem, das Imidazolisopiperidin, enthält. Nach bestimmten Analogien war zu vermuten, daß sie von großer Wirksamkeit auf die glatte Muskulatur, insbesondere auf den Uterus sein werde. Denn das Imidazoläthylamin hat die bekannten ungemein energischen Wirkungen der sympathomimetischen Basen, und Piperidin ist, im Gegensatz zu Pyridin, eine den Blutdruck steigernde Substanz. Die pharmakologische Prüfung der Imidazolyltehalydropyridinkarbonsäure, deren Ringsystem bis jetzt bei keinem in der Natur vorkommenden Alkaloid beobachtet wurde und auch bis jetzt synthetisch nicht dargestellt war, zeigte aber, daß diese Substanz, nach der Richtung der sympathomimetischen Basen wenigstens, unwirksam ist, was wohl nach Analogien zu schließen auf die Gegenwart der Carboxylgruppe bezogen werden kann.

Die Versuche der Veresterung der Carboxylgruppe, welche Welisch ausgeführt hat, führten, wenn auch auf Umwegen, zur Darstellung des Esters, welcher aber nur als Pikrat gefaßt werden konnte. Seine Versuche von dem Imidazolisopiperidincarbonsäurechlorhydrat aus durch starkes Erhitzen im Vakuum zum Imidazolisopiperidin zu gelangen, lieferten aber nur in minimaler Ausbeute eine sehr kleine Menge einer bei 258° schmel-

[1]) Diese Zeitschr. **49**, 173. 1913.

Digitized by Google

zenden, sauerstoffhaltigen Substanz, von der er nur mit 0,08 g eine Mikro-Dumas-Bestimmung machen konnte. Er schrieb dieser Substanz die Formel $C_6H_9N_3O \cdot 2\,HCl$ zu. Bei dieser Substanz war die Gegenwart des Sauerstoffs vorläufig unaufgeklärt. Eine Kohlenwasserstoffbestimmung war aus Mangel an Substanz und infolge der großen Schwierigkeiten der Darstellung nicht ausführbar.

Wir haben nun einen anderen Weg versucht, um zu einem positiven Resultate zu gelangen, einen Weg, der dadurch gegeben war, daß es viel einfacher ist, das Ausgangsmaterial, das Histidin zu decarboxylieren und auf diese Weise zu β-Imidazolyläthylamin zu gelangen, von dem aus ja durch die Synthese mit Methylal und Salzsäure das gewünschte Ringsystem sich darstellen lassen mußte.

Wir haben daher in bekannter Weise durch die bakterielle Decarboxylierung uns vorerst aus Histidinchlorhydrat das Chlorhydrat des β-Imidazolyläthylamin dargestellt.

Die dazu gehörigen Verfahren sind von Ackermann[1]) u. a. beschrieben; größtenteils sind sie in den D. R. P. 250 110, 252 872, 252 873, 252874, 256 116 niedergelegt. Histidin läßt sich durch Fäulnis in β-Imidazolyläthylamin überführen und aus dem Fäulnisgemenge mit Salzsäure und einem Alkaloidreagens niederschlagen. Die Carboxylgruppe aus Histidin läßt sich auch durch spezifische, auf gefaulter Thymussubstanz lebende Fäulniserreger in kurzer Zeit abspalten. Statt reines Histidin zu verwenden, kann man ein von anderen Aminosäuren möglichst befreites histidinreiches Eiweißhydrolysat verwenden. Das β-Imidazolyläthylamin kann man aus gefaulten Gemischen histidinreicher Eiweißhydrolysate in alkalischer Lösung mit Chloroform herausholen und die Base aus Chloroformauszügen mit verdünnter Salzsäure entziehen. Das Abscheidungsverfahren von O. Gerngroß[2]) mittels Benzoylchlorid, war zur Zeit der Ausführung dieser Untersuchung noch nicht bekannt.

Für die Darstellung des β-Imidazolyläthylamins[3]) kommen überhaupt hauptsächlich drei Methoden in Betracht: erstens aus Histidin durch Erhitzen mit Säuren, zweitens aus Histidin durch bakteriellen Abbau und drittens die Synthese. Die erste Darstellungsmethode ist die bequemste und sicherste für kleine Mengen, die letzte ist für große Mengen vorzuziehen. Wir wählen für unsere Versuche die bakterielle Entcarboxylierung und benützen sie als Ausgangspunkt für die Darstellung des Imidazolylisopiperidins und einiger seiner Derivate, von denen auch eine große physiologische

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **65**, 504. 1910.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **52**, S. 2304. 1919.

[3]) Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden, Abderhaldens I G. Barger, Bd. 8, S. 264—267.

Digitized by Google

Wirksamkeit zu erwarten war. Zum ersten Male wurde dieser bakterielle Abbau von Ackermann[1]) mit Zuhilfenahme von Fäulniserregern durchgeführt; er fand dabei, daß die Desaminierung bei Anwendung von Pepton besser geht, welches als Stickstoffquelle für diese Organismen dient und auf diese Weise die Desaminierung der Aminosäuren verhindert, so daß ein geringerer Verlust an der betreffenden Aminosäure stattfindet, eine Angabe, die nach Untersuchungen von C. Neuberg nicht ganz richtig ist[2]). Im Verlaufe zahlreicher Arbeiten haben Mellanby und Twort[3]), Berthelot und Bertrand[4]) mit verschiedenen Bakterien, welche aus Fäzes isoliert worden waren, Versuche angestellt. Diese Bakterien waren in hohem Grade imstande, Histidin zu entcarboxylieren. Das Prinzip der Isolierung war sowohl bei dem englischen wie bei den französischen Forschern das gleiche: oftmaliges Überimpfen der Mischkulturen in eine Histidinnährlösung und nach genügender Anhäufung des in Frage kommenden Organismus, Impfung auf Agar-Agar. Ob die Bacillen bei beiden Untersuchungen identisch waren, ist zweifelhaft, jedenfalls konnte man aber feststellen, daß eine ganze Reihe von Spaltpilzen existiert, die zur Entcarboxylierung befähigt ist. Diese Reinkulturen waren imstande, die Aminosäuren: Phenylalanin, Tyrosin, Histidin und Tryptophan, unter Abspaltung von Carboxylgruppen, in proteinogene Amine überzuführen, also die Alanin-Seitenkette in Äthylamin überzuführen. Man konnte solche Decarboxylierungen mit und ohne Hilfe von Peptonen durchführen, ebenso wie bei Verwendung von faulendem Pankreas, welches Bakterien dieser Art in reicher Menge enthält.

Die Lösung enthielt bei den Versuchen Berthelots und Bertrands bestimmte Mengen einiger anorganischer Salze, wie Magnesiumsulfat, Dikaliumphosphat, Kaliumnitrat, Calciumchlorid, denn benützt man Histidin als einzige Stickstoffquelle, so wird das im Anfange gebildete Imidazolyläthylamin schließlich wieder zerstört; der gleiche Vorgang wurde auch bei anderen Aminosäuren beobachtet. Mellanby und Twort benützen Peptonbouillon enthaltend 1% Histidin in Röhren mit Auszügen von Faeces. 5—7 Tage wurde diese anaerobe Züchtung im Brutschrank bei 37° stehen gelassen, hierauf in eine neue Röhre übergeimpft, das Verfahren wiederholt und mit der letzten Mischkultur eine peptonfreie Lösung, die außer Histidin Ammoniumtartrat, Dikaliumphosphat, Magnesiumsulfat, Calciumchlorid enthielt, infiziert. Durch Plattenkulturen auf Agar-Agar gelang es ihnen, jenen Bacillus zu isolieren, der Histidin sehr leicht entcarboxyliert. Dieser Bacillus gehört der Typhus-Coli-Gruppe an. Mellanby und Twort heben hervor, daß die Abspaltung der Kohlensäure aus dem Histidin sehr glatt und rasch gelingt, wenn man in geringen Mengen, z. B. in Reagensgläsern arbeitet, hingegen wirken größere Flüssig-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **65**, 504. 1910.

[2]) C. Neuberg, Diese Zeitschr. **37**, 490. 1911.

[3]) Journ. of physiol. **45**, 53—60.

[4]) Compt. rend. de l'acad. des sciences **154**, 1643—1645, 1826—1828; **165**, 1027—1030, 1567—1570.

Digitized by Google

keitsmengen schädlich. Beim Arbeiten in größerem Maßstabe raten sie daher die Histidinlösung mit entsprechend großen Mengen einer äußerst kräftig wirkenden Kultur zu infizieren; die Histidinlösung soll nicht stärker als 0,1% sein, am besten in Ringerscher Lösung gelöst und für jeden Liter die Kultur aus 2 Agar-Agar-Röhren angewendet. Die beste Inkubationszeit ist eine Woche. Die Menge des gebildeten Amins ermittelten die beiden englischen Forscher auf physiologischem Wege. Die nun folgende Trennung des Amins vom Histidin ist sehr leicht, da das Dipikrat der ersten Base viel leichter löslich ist, als das gleichzeitig entstehende Histidin-Monopikrat.

Die synthetische Darstellung nach Frank-Lee-Pyman[1]) ist für die Darstellung großer Mengen durchaus nicht so einfach wie die biochemischen Wege.

Wir versuchten sowohl mit faulendem Pankreas als auch mit den Twortbacillen in Reinkultur aus der Imidazolisopiperidincarbonsäure die Carboxylgruppe abzuspalten, aber in keinem dieser Versuche gelang es, die gewünschte Base zu erhalten; entweder erhielten wir das Ausgangsmaterial oder konnten überhaupt nichts isolieren. Es hat sich also gezeigt, daß die Bakterien, welche leicht eine ω-ständige Carboxylgruppe abspalten, die am Kernkohlenstoff stehende Carboxylgruppe nicht abzuspalten vermögen.

Von dem durch Fäulnis dargestellten β-Imidazolyläthylamin haben wir durch Kondensation mit Methylal und konzentrierter Salzsäure den gewünschten Körper, das Imidazolisopiperidinchlorhydrat dargestellt und eine Reihe von Derivaten dieser Verbindung studiert. Es hat sich entsprechend der theoretischen Voraussetzung mit Bezug auf die Wirksamkeit herausgestellt, daß die Substanz das so wirksame proteinogene Amin, das β-Imidazolyläthylamin, weit übertrifft und gleichsinnig wirkt. Aus dem Chlorhydrat wurde die freie Base gewonnen Um das erhaltene Produkt, das Imidazolylisopiperidin näher zu charakterisieren, wurde das Pikrat, Pikrolonat, das Gold-, Platin- und Quecksilbersalz dargestellt und analysiert, welche sämtlich sehr schön krystallisierte Körper sind. Da nun 2 Imidwasserstoffe vorhanden sind, so suchten wir diese durch Acetyl- und Benzoylreste zu ersetzen. Während bei der Acetylierung die Substanz nur ein Monoacetylderivat gab, erhielten wir bei der Benzoylierung ein Dibenzoylderivat. Da nun die Idee, zu den geschlossenen Ringsystemen aus den decarboxylierten Aminosäuren zu gelangen,

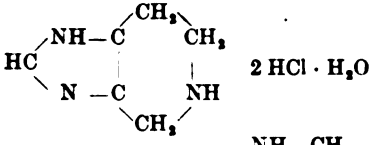
[1]) Journ. Chem Soc. **99**, 339. 1911.

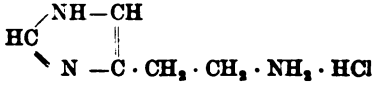
Digitized by Google

gegeben war, und man nicht von den Aminosäuren ausgehen muß, haben wir es nicht unterlassen, das 7-Oxytetrahydroisochinolin darzustellen, welches bereits Amé Pictet und Theodor Spengler[1]) in der Weise gewonnen haben, daß sie Tyrosin und Methylal und konzentrierte Salzsäure kondensierten und 7-Oxytetrahydroisochinolin-3. carbonsäure darstellten, diese über ihren Schmelzpunkt erhitzten und so eine bei 210—218° (18 mm) destillierende ölige Base erhielten. Wir haben den gleichen Körper aus dem synthetisch leicht zugänglichen Tyramin[2]) dargestellt, welches man aus p-Hydroxyphenyläthylamin durch Reduktion von p-Hydroxyphenylacetonitril erhalten kann. Wir haben nun das Tyramin mit Methylal und konzentrierter Salzsäure kondensiert und das Pikrat der Verbindung dargestellt.

Experimenteller Teil.

Darstellung von Imidazol-iso-piperidin-chlorhydrat.



5 g β-Imidazolyläthylamin 

wurden mit 20 ccm konzentrierter Salzsäure versetzt, die Lösung in einem mit Rückflußkühler versehenen Kölbchen am Wasserbade erwärmt und nach und nach 6 g Methylal aus einem Scheidetrichter zutropfen gelassen.

Das Reaktionsprodukt wurde mit Wasser eingedampft bis zur völligen Entfernung der Salzsäure. Aus Alkohol umkrystallisiert, krystallisierte der Körper in sehr schön ausgebildeten Krystallen. Er ist sehr leicht in Wasser löslich. Schmelzpunkt 253° (Block, Maquenne).

Krystallographischer Befund. Es sind parallel stehende, flache Säulchen, die fast wie Krystallstöcke aussehen. Die Flächen z. T. gekrümmt. Die Auslöschung bildet mit der letzten Kante einen Winkel von ca. 11°. Ob α oder γ ist nicht zu sehen, da die Krystalle zu dick sind. Im Konoskop erscheint eine schief austretende Achse, die negativen Charakter der Doppelbrechung zeigt. Demgemäß ist auf triklines System zu schließen.

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 2030. 1911.

[2]) Barger, Journ. Chem. Soc. **95**. 1909.

Digitized by Google

In einem Quetschpräparat fanden sich nicht orientierbare Splitter, welche die spitze Mittellinie (negativ) und einen ziemlich großen Achsenwinkel zeigten.

Zur Analyse wurde der Körper noch zweimal aus Alkohol umkrystallisiert. Er erwies sich krystallwasserhältig. Die Substanz verliert das Krystallwasser bei 105°. Krystallwasserbestimmung:

33,862 mg vakuumtrockne Substanz bei 105° getrocknet geben 31,032 mg Substanz. Verlust: 2,83 mg H_2O.

53,530 mg Substanz geben bei 105° getrocknet 48,920 mg. Verlust 4,61 mg H_2O.

Für $C_6H_9N_3 \cdot 2\,HCl \cdot H_2O$ berechnet — 8,42% H_2O

gefunden — $\left\{\begin{matrix}8{,}37\%\,H_2O\\8{,}61\%\,H_2O\end{matrix}\right\}$ Mittel 8,49% H_2O.

Kohlenstoff- und Wasserstoff-Bestimmung der krystallwasserhältigen Substanz (im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet).

4,216 mg Substanz 5,12 mg CO_2; 2,28 mg H_2O.
0,1102 g Substanz — 0,1363 g CO_2; 0,0654 g H_2O.

Halogenbestimmung: 3,53 mg Substanz — 4,715 mg AgCl.

Stickstoffbestimmung: 2,53 mg Substanz (739 mm 10°) — 0,422 ccm N
3,67 mg „ (741 mm 15°) — 0,631 ccm N
2,02 mg „ (742 mm 11°) — 0,336 ccm N

Für $C_6H_9N_3 \cdot 2\,HCl \cdot H_2O$

berechnet	C 33,64%	H 6,12%	N 19,63%	Cl 33,13%
gefunden	33,84%	6,18%	19,51%	33,04%
	33,74%	6,64%	19,84%	
			19,52%	

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung der krystallwasserfreien Substanz:

4,68 mg Substanz — 6,34 mg CO_2; 2,38 mg H_2O.

Stickstoffbestimmung: 2,82 mg Substanz (748 mm 15°) 0,518 ccm N

Für $C_6H_9N_3 \cdot 2\,HCl$: berechnet C 36,73% H 5,65% N 21,38%
gefunden 36,96% 5,69% 21,43%

Imidazolpiperidin-Dipikrat $C_6H_9N_3(C_6H_2(NO_2)_3OH)_2$.

0,02 g Imidazolisopiperidinchlorhydrat und 0,08 g Natriumpikrat wurden in wässeriger Lösung zusammengegeben. Es bildeten sich sehr schöne Krystalle. Sie sind schwer löslich in Wasser und Alkohol. Unlöslich in Äther und Benzol. Sie wurden dreimal aus heißem Wasser umkrystallisiert. Bei 110° getrocknet, erwiesen sie sich krystallwasserfrei. Schmelzpunkt (Block Maquenne) 220°, (Thiele unkorr.) 212°.

Digitized by Google

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung: 2,89 mg Substanz — 3,96 mg CO_2, 0,68 mg H_2O.

Stickstoffbestimmung:

0,91 mg Substanz (750 mm 19°) — 0,172 ccm N
2,53 mg „ (740 mm 15°) — 0,479 ccm N

Für $C_6H_9N_3(C_6H_2(NO_2)_3OH)_2$

	C	H	N
berechnet	37,27%	2,60%	21,69%
gefunden	37,38%	2,63%	21,80%
			21,85%

Krystallographischer Befund. Die Substanz wurde in Glycerin eingebettet. Sie bildet sehr dünne Blättchen, spieß- und kammförmige Krystallskelette von hochgelber Farbe, Perlmutterglanz und (für org. Substanzen) mit nicht hoher Licht- und Doppelbrechung. Die Blättchen zeigen die Farben der zweiten und dritten Ordnung. Die Skelette zeigen α in der Längsrichtung. Im polarisierten Licht schiefe Auslöschung von 9°40′ gegenüber der einzigen erkennbaren Kantenrichtung. Im konvergenten Licht erscheint ein verschwommenes unsymmetrisches Achsenbild, dessen Charakter an der vorliegenden Probe nicht erkannt werden konnte. Achsenwinkel anscheinend sehr groß.

Imidazolpiperidin-Dipikrolonat
$C_6H_9N_3(C_{10}H_8O_5N_4)_2 + C_2H_5OH$.

0,03 g Imidazolisopiperidinchlorhydrat wurden in einem Tropfen Wasser gelöst und mit 0,14 g Pikrolonsäure in verdünnter alkoholischer Lösung zusammengebracht. Es bildete sich ein Niederschlag, der abgesaugt und mehrere Male mit Alkohol gut gewaschen wurde. Dieser Körper ist in Wasser leicht, in Alkohol schwer löslich, unlöslich in Äther und Benzol. Es wurde viermal aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 250° (Block Maquenne).

Dieser Körper hat beim Erhitzen von 100°—110° einen Gewichtsverlust erlitten, welcher genau einem Krystallalkohol entspricht. Der Krystallalkohol geht bei ca. 105° weg.

Krystallalkoholbestimmung: 128,45 mg Substanz geben nach dem Trocknen 127,60 mg. Verlust 0,85 mg.

Für $C_6H_9N_3(C_{10}H_8O_5N_4)_2 + C_2H_5OH$: berechnet 6,53%
gefunden 6,62%

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung der krystallalkoholfreien Substanz:

5,03 mg Substanz — 1,78 mg H_2O, 8,87 mg CO_2
4, 2 mg „ — 1,44 mg H_2O, 7,27 mg CO_2

Stickstoffbestimmung:

3,31 mg Substanz (749 mm 18°) — 0,679 ccm N
2.27 mg „ (749 mm 20°) — 0,469 com N

Digitized by Google

Für $C_6H_9N_3(C_{10}H_8O_5N_4)$:

berechnet	C 47,92%	H 3,87%	N 23,66%
gefunden	48,09%	3,96%	23,72%
	48,12%	3,91%	23,73%

Stickstoffbestimmung der krystallalkoholhaltigen Substanz:

3,2 mg Substanz 0,617 ccm N (740 mm 15°)
3,17 mg „ 0,581 ccm N (748 mm 17°)

Für $C_6H_9N_3(C_{10}H_8O_5N_4)_2 + C_2H_5OH$: berechnet 22,09% N
gefunden 22,25%
22,22%

Krystallographischer Befund. Diese Substanz bildet Krystallskelette, welche ziemlich dicke, plumpe, kammförmige Komplexe sind. Hochgelb, infolge der geringen Ausdehnung der einzelnen Individuen makroskopisch glanzlos. Ziemlich hohe Licht- und Doppelbrechung. Im parallelen, polarisierten Licht auch bei Quetschpräparaten kein Bild, das über die optische Orientierung Auskunft gäbe. Einzelne Partikelchen geben im Konoskop ein klares symmetrisches Bild; getroffen ist die negative Mittellinie, welche anscheinend dem spitzen, aber großen Achsenwinkel angehört.

Auch die über 110° erhitzte und von Krystallalkohol befreite Substanz ist krystallinisch. Es sind sehr kleine, hochgelbe Körnchen mit ziemlich starker Licht- und Doppelbrechung. Die Gestalt ist ganz unregelmäßig, an einzelnen Splitterchen ist ein verwaschenes Achsenkreuz sichtbar.

Imidazolpiperidin-goldchlorid $C_6H_9N_3 \cdot AuCl_3$.

Die wässerige Lösung des Imidazolisopiperidinchlorhydrats wurde mit 30proz. Goldchloridlösung gefällt. Die gebildeten Kryställchen wurden abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Dieser Körper ist löslich in Alkohol, unlöslich in Äther und Benzol. Schmelzpunkt 217° (Thiele).

Es sind außerordentlich dünne Blättchen und Nädelchen, welche trotz ihrer starken hochgelben Eigenfärbung ganz niedrige Interferenz zeigen (grau). Eine krystallographische Begrenzung ist nicht festzustellen. Im Konoskop zeigt sich ein unsymmetrisches Bild, welches eine Achse und die negative Mittellinie umfaßt.

Analyse: Durch Glühen im Tiegelchen wurde der Goldgehalt ermittelt: 9,53 mg Substanz — 4,52 mg Au.

Für $C_3H_3N_3 \cdot AuCl_3$: berechnet 47,29% Au
gefunden 47,43%.

Digitized by Google

Imidazolpiperidinplatinchlorid $C_6H_9N_3 \cdot PtCl_6 + H_2O$.

0,2 g Imidazolisopiperidinhydrochlorid wurden in sehr wenig Wasser gelöst und mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt. Die Kryställchen wurden abgesaugt und mit Alkohol gewaschen. Sie sind löslich in Wasser, wenig löslich in Benzol. Dieser Körper hat keinen Schmelzpunkt, zersetzt sich unscharf bei 280°. Er bildet sehr starke doppeltbrechende kleine Stäbchen und Körnchen von stark gelber Farbe, die aber nicht auslöschen. Die Substanz wurde im Vakuum getrocknet.

Platinbestimmung (ermittelt durch Glühen im Tiegelchen): 21,29 mg Substanz — 7,61 mg Pt.

Für $C_6H_9N_3 \cdot PtCl_6 + H_2O$: berechnet Pt 35,55%
gefunden 35,74%

Krystallwasserbestimmung: Der Körper wurde bis 111° erhitzt. Der Verlust von Wasser findet bei 105° statt. 20,485 mg Substanz 0,66 mg H_2O—
berechnet 3,28% H_2O
gefunden i3,38%

Kohlenwasserstoffbestimmung der wasserfreien Substanz:
4,88 mg Substanz 2,45 mg CO_2, 0,88 mg H_2O, 1,80 mg Pt.

Für $C_3H_3N_3 \cdot PtCl_3$: berechnet C 13,56% H 1,71% Pt 36,75%
gefunden 13,69% 2,02% 36,88

Imidazolpiperidinquecksilberchlorid $C_6H_9N_3(HgCl_2)_4$.

Die wässerige Lösung des Imidazolisopiperidinchlorhydrats wurde mit wässeriger Sublimatlösung gefällt. Die Kryställchen abgesaugt und gewaschen. Aus Wasser umkrystallisiert. Diese Substanz ist unlöslich in Äther und Benzol, wenig löslich in Alkohol. Schmelzpunkt 210° (Thiele).

Es ist ein äußerst feinkörniges krystallinisches Pulver von recht hoher Doppelbrechung. Gelegentlich finden sich sprudelförmige Körperchen, welche einheitlich auslöschen und ein sehr verschwommenes Achsenbild, offenbar die optische Normale, bilden.

Diese Substanz erwies sich beim Trocknen bei 110° als krystallwasserfrei. Zur Analyse wurde die im Vakuum über Schwefelsäure getrocknete Substanz verwendet.

Stickstoffbestimmung: 6,55 mg Substanz (740 mm 18°) — 0,195 ccm N

Chlorbestimmung: 33,30 Substanz wurden in heißem Wasser gelöst und bei Gegenwart von Salpetersäure mit Silbernitrat gefällt. Im Mikro-Platin-Gooch-Tiegel abgesaugt, getrocknet und gewogen — 32,25 mg AgCl.

Für $C_6H_9N_3(HgCl_2)_4$: berechnet N 3,56%, Cl 24,01%
gefunden 3,40,% 23,96%.

Digitized by Google

N-Acetyl-Imidazolisopiperidinchlorhydrat $C_6H_8N_2 \cdot COCH_3 \cdot HCl + H_2O$.

0,14 g Imidazolisopiperidinchlorhydrat wurden mit Essigsäureanhydrid und frisch geschmolzenem Natriumacetat in einem Kölbchen 2 Stunden am Drahtnetz mit kleiner Flamme erhitzt. Zur Entfernung des überschüssigen Anhydrids wurde mit Alkohol einige Male abgedampft. Beim Eingießen in Wasser fällt nichts aus. Das Reaktionsprodukt wurde daher in Wasser gegossen, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt, abgesaugt und gewaschen. Der Niederschlag wurde mit Baryumhydroxyd verrieben und abfiltriert. Der Baryumüberschuß wird mit Kohlensäure in der Wärme ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde eingedampft. Den restierenden Syrup konnte man nicht zur Krystallisation bringen. Er wurde mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt. Das Chlorhydrat krystallisierte. Es ist leicht löslich in Wasser, schwer in Alkohol, unlöslich in Äther und Benzol. Das Chlorhydrat wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 235° (Block Maquenne).

Diese Substanz ist auch in Glycerin löslich, daher wurde sie ohne Einbettung krystallographisch bestimmt. Es sind teils große, unregelmäßig begrenzte, aber einheitlich auslöschende Platten, perlmutterglänzend weiß, teils rechtwinklig begrenzte Platten von geringer Doppelbrechung. Im polarisierten Licht mit einer schiefen Auslöschung von 7°. Der optische Charakter ist nicht näher zu bestimmen, da das konoskopische Bild nur ein verwaschenes dunkles Kreuz gibt.

Stickstoffbestimmung: 3,43 mg Substanz — 0,578 ccm N (742 mm 23°).

Für $C_6H_8N_2 \cdot COCH_3 \cdot HCl + H_2O$: berechnet 19,14% N
gefunden 18,97%

Krystallwasserbestimmung: 88,0 mg Substanz 7,05 mg H_2O;
berechnet 8,20% H_2O
gefunden 8,01%

Der Krystallwasserverlust erfolgt bei ca. 115°. Dieser Körper ist sehr hygroskopisch.

N-Dibenzoylimidazolisopiperidin $C_6H_7N_3(COC_6H_5)_2 + H_2O$.

0,12 g Imidazolisopiperidin wurden nach Schotten-Baumann mit Natronlauge und Benzoylchlorid benzoyliert. Der gebildete Niederschlag wurde abgesaugt und gut mit Wasser gewaschen. Er wurde aus Alkohol, in dem er schwer löslich ist, zweimal umkrystallisiert. Schmelzpunkt 215° (Thiele).

Digitized by Google

Es sind äußerst feine Nädelchen, welche α in der Längsrichtung zeigen.

Stickstoffbestimmung:

1,405 mg Substanz 0,142 ccm N (739 mm 22°)
2,310 mg „ 0,252 ccm N (747 mm 17°)

Für $C_6H_7N_3 \cdot (COC_6H_5)_2 + 2\,H_2O$: berechnet 11,44% N
gefunden 11,37%
11,27%

Imidazol-iso-Piperidin.

Das Imidazolisopiperidinchlorhydrat wurde in Wasser gelöst und mit Silbercarbonat geschüttelt und abfiltriert. Der Niederschlag mit Alkohol ausgezogen und die Lösung im Exsiccator stehen gelassen. Es krystallisierte ein Körper, welcher an der Luft zerfließlich ist und dessen Schmelzpunkt bei 110° liegt.

Die weiteren Bestimmungen konnten aus Mangel an Substanz nicht ausgeführt werden.

Oxyhydroisochinolin.

5 g Tyramin wurden mit 100 ccm konzentrierter Salzsäure in einem Kölbchen versetzt und unter Verwendung eines Rückflußkühlers am Wasserbade erhitzt und tropfenweise 10 g Methylal zufließen gelassen. Nachdem alles Methylal abgeflossen war, wurde noch über eine Stunde erhitzt, im ganzen 10 Stunden. Das Reaktionsprodukt ist dunkelgrün gefärbt, in der Siedehitze hellbraun. Es wurde in Wasser gelöst und mit Salzsäure das Chlorhydrat gefällt.

Dieses Chlorhydrat gibt, in Wasser gelöst, mit pikrinsaurem Natrium ein gut ausgebildetes krystallisiertes Pikrat. Es ist unlöslich in Wasser, verdünntem und gewöhnlichem Alkohol, Benzol und Chloroform, wenig löslich in Amylalkohol und im absoluten Alkohol. Es hat keinen Schmelzpunkt, aber zersetzt sich bei 195°. Pictet und Spengler[1]) erhielten ein Pikrat, welches bei 198—201° schmilzt.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung: 0,1135 g Substanz, 0,1984 g CO_2 0,0364 g H_2O.

Stickstoffbestimmung: 0,2154 g Substanz 27,6 ccm N (752 mm 15°).

Für $C_6H_{10}NO(C_6H_2OH(NO_2)_3)$

berechnet	C 47,71%	H 3,47%	N 14,89%
gefunden	47,67%	3,58%	15,03%

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 44, S. 2036. 1911.

Digitized by Google

Physikalisch-chemische Beiträge zum Problem der Blutgerinnung.

Von

Edgar Atzler und **Erich Döhring.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingangen am 21. Juli 1920.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Seit den grundlegenden Entdeckungen Alexander Schmidts und Hammerstens, sowie ihrer Schüler ist eine große Anzahl Arbeiten erschienen, die in ihrer Gesamtheit wertvolle Aufklärung über das Gerinnungsproblem liefern.

In dem Morawitzschen Gerinnungsschema sind die besten Arbeiten zu einem harmonischen Ganzen vereinigt worden. Das Lehrgebäude der Blutgerinnung kann damit als im Rohbau vollendet betrachtet werden. Es müssen aber noch viele Bausteine zusammengetragen werden, bis man sagen kann, daß das Gerinnungsproblem eine befriedigende Lösung gefunden hat.

Die gewaltigen Fortschritte, die in den letzten Jahren die physikalische Chemie, insbesondere die Kolloidchemie zu verzeichnen hatte, befruchteten auch die Gerinnungslehre des Blutes. Es sei hier nur an die interessanten Arbeiten Hekmas[1]) erinnert, in denen die Blutgerinnung unter dem Gesichtspunkt der Umwandlung des Sol- in den Gelzustand betrachtet wird. Diese Studien regen dazu an, noch weitere Beziehungen zur Kolloidchemie anzubahnen. Dies erscheint uns aber um so aussichtsreicher, als schon von rein naturwissenschaftlicher Seite Untersuchungen angestellt worden sind, welche uns die Anknüpfung erleichtern. Daß das Fibrinogen bei der Gerinnung eine physikalische Zustandsänderung erleidet, ist eine sinnfällige Erscheinung; ob gleichzeitig chemische Prozesse einhergehen, vermögen wir noch nicht mit Sicherheit zu entscheiden. Handelt es sich nun lediglich um eine Dispersitätsänderung, so hätten wir den interessanten Fall, daß ein Ferment (Thrombin) — sofern man ihm überhaupt Fermentcharakter zubilligen darf — die Amikronen des Fibrinogens über das Gebiet der Ultramikronen in die gequollenen Mikronen überführt.

[1]) Hekma, Diese Zeitschr., **74**, 63 u. 219.

Digitized by Google

Für die Frage, ob es sich bei der Bildung des Fibrins aus dem Fibrinogen um eine tiefergreifende chemische Umwandlung oder vorwiegend um eine Änderung des Kolloidzustandes handelt, ist die Erforschung der rein physikalisch-chemischen Begleiterscheinungen der Blutkoagulation von besonderer Wichtigkeit. In erster Linie muß die Frage der Wärmetönung beim Blutgerinnungsvorgang auf das genaueste untersucht werden.

I. Gerinnungswärme des Blutes.

Wiedemann und Lüdeking[1]) haben gefunden, daß bei der Gerinnung von kolloidaler Kieselsäure oder von Eiweiß Wärme entwickelt wird. Die Wärmentwicklung beträgt für 1 g Kieselsäure 11,3—12,2 cal., für 1 g frisches Eiereiweiß 12,1 bis 12,4 cal. Umgekehrt ist natürlich die Lösung von Gelatine, Eiweiß oder Kieselsäure mit einer Wärmeabsorption verbunden.

Wir legten uns nun die Frage vor, ob auch bei der Blutgerinnung, die ja grob mechanisch einem Gelatinierungsprozeß ähnelt, ebenfalls eine Wärmetönung auftritt.

Aus der Literatur ergibt sich, daß ältere Autoren, so Valentin 1844[2]), Schiffer 1868[2]), Lépine 1876[3]) und Frédériq 1877[4]) übereinstimmend eine positive Gerinnungswärme gefunden haben. Die Resultate dieser einzelnen Arbeiten schwanken recht beträchtlich. Neueren Datums ist eine Arbeit von Jolyet und Sigalas[5]); diese Verff. finden, daß die spontane Gerinnung frischen Blutes unter positiver Wärmetönung verläuft; bei einer sekundären Gerinnung von Oxalblut auf Zusatz von Calciumchlorid wird jedoch keine Wärme frei. Den ersten Fall untersuchten die genannten Autoren in der Weise, daß zwei gleiche Messingcalorimeter, deren einer Kaliumoxalat, deren anderer Zucker enthielt, mit Blut aus der Arterie eines Hundes beschickt wurden. Es wurde dann die Abkühlungsgeschwindigkeit der beiden Blutproben vergleichend verfolgt. Im zweiten Fall ließen sie Oxalblut auf Zimmertemperatur abkühlen und brachten es mit gleichtemperierter Calciumchloridlösung zusammen. Das Thermometer, an dem die Ablesung stattfand, wurde in die gerinnende Flüssigkeit gestellt. Eine Rührvorrichtung war nicht vorgesehen. Das Fehlen einer Rührvorrichtung dürfte jedenfalls eine nicht unerhebliche Fehlerquelle

---

[1]) Wiedemann und Lüdeking, Wiedemanns Ann. 25, 145. 1885.

[2]) Valentin und Schiffer, zit. nach Compt. rend de la soc. de biol. 45, 993.

[3]) Lépine, Note sur la chaleur développée pendant la coagulation du sang. Gaz. méd. de Paris. 1876.

[4]) Frédériq, Recherches sur la coagulation du sang. Bruxelles 1877.

[5]) Jolyet und Sigalas, Compt. rend. de la soc. de biol. 45, 993.

Digitized by Google

bei diesen Versuchen gewesen sein. Auch erscheint es uns zweckmäßiger, statt des Vollblutes zum Experiment zunächst denjenigen Bestandteil des Blutes, in dem allein die Gerinnung vor sich geht, nämlich das Plasma, zu isolieren.

Aus der herangezogenen Literatur ersieht man, daß ein tatsächliches Bedürfnis vorliegt, die Frage der Wärmetönung bei der Blutgerinnung einer erneuten Prüfung zu unterziehen. Zu diesem Zwecke wurde folgender Weg eingeschlagen.

Beschreibung der Apparatur.

Als Calorimetergefäß diente uns ein Weinholdbecher von 12 cm innerer Höhe und 7 cm lichtem Durchmesser. Den Deckel bildete eine starke Korkscheibe mit drei Bohrungen; durch je eines dieser Bohrlöcher wurde das Beckmannthermometer, ein für die Aufnahme des Plasmas bestimmter weithalsiger Kolben und ein Glasrührer gesteckt. In den Kolben wurde ein dünnwandiges, unten kugelig aufgeblasenes Reagensglas gehängt, das zur Aufnahme des Serums und eines Glasstabes dienen sollte. Mit dem Glasstabe wurde im geeigneten Moment das Reagensglas durchstoßen, so daß sich Plasma und Serum mischen konnten. Wir haben also drei Räume zu unterscheiden; in dem innersten befand sich Serum, in dem mittleren Plasma und in dem äußersten Raum destilliertes Wasser. In dem Wasser befanden sich das Beckmannthermometer und der Rührer. Das Beckmannthermometer war mit besonderer Sorgfalt von der Firma C. Richter, Berlin, hergestellt und von der P. T. R. geeicht worden. Die Führung des Rührers und sein Bewegungsmechanismus waren außerhalb des Calorimeters angebracht worden, um die Reibungswärme auf ein Minimum zu reduzieren. Durch einen in gehöriger Entfernung vom Calorimeter aufgestellten Heinricischen Heißluftmotor wurde der Rührer ca. 60 mal in der Minute gehoben und gesenkt. Die Hubhöhe betrug 3 cm.

Besonderer Wert wurde auf eine möglichst konstante Zimmertemperatur gelegt. In den ersten Versuchen, an denen sich Fräulein stud. med. Meissner beteiligte, war überdies ein elektrischer Heizkörper in dem Weinholdbecher eingebaut worden, um nach den bekannten Prinzipien der Calorimetrie die Gerinnungswärme zahlenmäßig ausdrücken zu können. Da aber — um das Resultat vorwegzunehmen — die Gerinnungswärme gleich Null war, so verzichteten wir bei den weiteren Versuchen auf die elektrische Heizvorrichtung. Unser Hauptaugenmerk war vielmehr darauf gerichtet, ob überhaupt qualitativ eine, wenn auch noch so kleine Wärmetönung während der Blutgerinnung zu beobachten war.

Ausführung der Messung.

Der Gerinnungsvorgang erstreckt sich unter normalen Verhältnissen über einige Minuten. Bringt man Plasma und Serum zu gleichen Teilen im Reagensglas zusammen, so bemerkt man zunächst nach einer von Fall zu Fall wechselnden Zeit eine Trü-

Digitized by Google

bung, die im weiteren Verlauf der Reaktion immer mehr zunimmt; dann folgt ein Stadium der Zäh- und Dickflüssigkeit und hieran schließt sich erst die kompakte Gerinnung an; diese äußert sich darin, daß man das Reagensglas umkehren kann, ohne daß der Inhalt herausfließt.

Ist nun dieser Erscheinungskomplex von einer Wärmetönung begleitet, so werden wir die Temperaturänderung des Systems um so schärfer verfolgen können, je kürzer die Zeit ist, in welcher die Reaktion durchlaufen wird. Um dies zu erreichen, haben wir in der bekannten Weise das Serum durch Alkali-Säurebehandlung aktiviert. Da die beim Aktivieren mit Normalnatronlauge und Normalsalzsäure gebildete Kochsalzmenge nur 87,8 mg betrug, und da sich diese Salzmenge auf 50 ccm verteilte, so ist die Verdünnungswärme so gering, daß sie in die Fehlergrenzen fällt[1]).

Der Gang der Messung spielte sich nun in folgender Weise ab. Die Vorratsflaschen mit Serum und Plasma wurden mehrere Stunden vor Anstellung des Versuches in ein Wasserbad von Zimmertemperatur gestellt. Dann wurde das Serum rasch aktiviert und die 3 Räume des Calorimeters wurden mit Serum (15 ccm), Plasma (35 ccm) und Wasser (200 ccm) beschickt. Mit einer Lupe wurde alle halben Minuten am Beckmannthermometer bis auf halbe Tausendstel Grade abgelesen; um die Trägheit des Quecksilberfadens auszuschalten, wurde in regelmäßigem Rhythmus an das Thermometer geklopft. Nach durchschnittlich 30 Minuten konnte angenommen werden, daß sich kleine Temperaturdifferenzen im Innern des Calorimeters ausgeglichen haben. Zeigte das Thermometer einen regelmäßigen Gang, d. h. blieb die Differenz zweier aufeinanderfolgender Ablesungen konstant, so wurde die Reaktion eingeleitet, indem das Reagensglas durchstoßen wurde; es konnte sich dann das Serum mit dem Plasma mischen. In einem Kontrollversuch außerhalb des Calorimeters wurde die Gerinnungszeit unter analogen Verhältnissen bestimmt.

Um zu prüfen, nach welcher Zeit eine im Plasmakolben stattfindende Erwärmung in der Außenflüssigkeit meßbar wird, wurde folgender Kontrollversuch angestellt. Im Wasserraum befanden sich wiederum 200 ccm Wasser, der Plasmakolben war

[1]) Das ergibt sich aus den Tabellen über Verdünnungswärmen von Kochsalzlösungen. Landolt, Börnstein und Roth, Physik.-chem. Tabellen. S. 850.

Digitized by Google

mit 45 ccm gleichtemperierten Plasmas angefüllt. Sobald ein regelmäßiger Thermometergang eingetreten war, wurde mit einer Pipette 5 ccm physiologische Kochsalzlösung, deren Temperatur 5° höher war als die des übrigen Systems, in den Plasmakolben eingefüllt. Es war zu erwarten, daß sich die 50 ccm in dem Plasmakolben um 0,5° erwärmen würden, dies würde einer Temperatursteigerung der Außenflüssigkeit um 0,1° entsprechen. In der Tat konnte im Verlauf der nächsten 8 Minuten eine Temperaturzunahme um 0,09° abgelesen werden.

Die Versuchsergebnisse.

In der geschilderten Weise wurden 34 Messungen angestellt, aus denen sich übereinstimmend ergab, daß die Blutgerinnung von keiner in unserer Apparatur meßbaren Wärmetönung begleitet ist. Ein Protokoll möge zur Erläuterung beigefügt werden.

Vorperiode		Hauptperiode (Fortsetzung)	
2,6765		2,6780	
2,6765	Gang 1.	2,6780	
2,6770 + 0,000114		2,6785	Gang 2 = 0,000087
2,6770		2,6785	
2,6770		2,6785	
2,6770		2,6785	
		2,6785	
Hauptperiode		2,6785	
2,6770	Durchstoßen d. Reagensglases	2,6785	
2,6770		2,6785	
2,6775		2,6790	
2,6775	Eintritt der Gerinnung	2,6790	
2,6775		2,6790	
2,6775		2,6790	
2,6780		2,6790	
2,6780		2,6790	

Über die Gangberechnung hat der eine von uns[1]) schon in dieser Zeitschrift berichtet; da hier das gleiche Rechnungsverfahren angewandt wurde, kann auf diese Arbeit verwiesen werden. Die fünfte und sechste Gangdezimale ist durch Rechnung entstanden; garantieren kann man nur bis zur 4. Dezimale. Runden wir ab, so erhalten wir für Gang 1 und Gang 2 die Zahl 0,0001.

Wenn nun auch aus diesen Resultaten hervorgeht, daß bei der Blutgerinnung eine meßbare Wärmetönung nicht auftritt,

[1]) E. Atzler und F. Richter, diese Zeitschr. **100**, 193. 1919.

Digitized by Google

so kann man von diesem Ergebnis nicht ohne weiteres eine Parallele zu den Resultaten von Wiedemann und Lüdeking ziehen. Jene Forscher arbeiteten mit einem konzentrierten Kolloid; bei uns handelt es sich aber um ein Kolloid, dessen Konzentration nur $^1/_{200}$. beträgt. Die bei der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin evtl. doch freiwerdende Wärme würde also dem geringen Prozentgehalt entsprechend klein sein und könnte so dem Nachweis entgehen.

In unseren Versuchen arbeiteten wir mit 0,175 g Fibrinogen; würde die Gerinnungswärme des Fibrinogens derjenigen der Kieselsäure gleich sein, so hätten wir eine Wärmemenge von 2,1 cal. zur Verfügung, die sich gleichmäßig über 250 ccm Wasser + Serum + Plasma verteilt. Dies würde aber einer Temperaturzunahme von 0,008° am Beckmannthermometer bedingen. Dieser Wert würde der Beobachtung nicht entgehen. Für die Gerinnung von 1 g „Eiweiß Trommsdorf" geben die genannten Autoren 2,8 cal. an. Diese Wärmemenge würde für unsere Versuchsanordnung an der Grenze des Nachweises liegen, wenn man berücksichtigt, daß das Beckmannthermometer nur bis 0,001° zuverlässig arbeitet. Das Ergebnis dieses Abschnittes läßt sich dahin zusammenfassen, daß eine Wärmetönung bei der Gerinnung nicht ausgeschlossen ist, daß sie aber pro Gramm Fibrinogen unter 1,5 cal. liegen muß.

II. Ist die Blutgerinnung mit einer Volumenänderung verbunden?

Nachdem wir gefunden haben, daß eine nachweisbare Wärmeentwicklung bei der Blutgerinnung nicht auftritt, soll jetzt weiter untersucht werden, ob bei dem Gerinnungsvorgang eine äußere Arbeitsleistung (Volumenänderung) zu beobachten ist.

Sigalas stellte im Jahre 1904 derartige Versuche an. Er maß die Volumenänderungen bei spontaner Gerinnung von 4 bis 5 proz. Gelatinelösung, von Milch mit Labferment und von Pferdeoxalatplasma auf Zusatz von Calciumchlorid. Die Messungen wurden in einem 250-ccm-Kolben ausgeführt, auf den ein kalibriertes Steigrohr aufgesetzt war, so daß Volumänderungen von $^1/_{20}$ ccm abgelesen werden konnten. Der Kolben war frei in der Luft aufgehängt, die nach Möglichkeit gleichtemperiert blieb. Der Autor fand, daß das Volumen bei allen 3 Kolloidarten konstant blieb.

Digitized by Google

Eine Ablesung auf $^1/_{20}$ ccm, d. h. auf 1 : 5000 des Gesamtvolumens kann aber nicht den Anspruch machen, die Frage der Volumenänderung bei der Gerinnung zu entscheiden. Bedenkt man, daß es sich um eine Aggregatszustandsänderung des Fibrinogens handelt, das nur den 200. Teil der Gesamtblutmenge ausmacht, so folgt, daß man die Bestimmung mit viel größerer Genauigkeit vornehmen muß.

Beschreibung der Apparatur.

In einem 15 l Wasser fassenden Thermostaten wurde ein Pyknometer von 50 ccm Inhalt mit Capillare von 1 mm lichtem Durchmesser so befestigt, daß sich die Öffnung des Halses 4 mm über dem Wasserspiegel befand. Der Meniscusstand wurde mit Hilfe eines Ablesemikroskops durch ein Okularmikrometer beobachtet. Die Vergrößerung war so gewählt, daß 100 Teilstriche am Mikrometer 4 mm an der Capillare entsprachen. Das Thermostatenwasser wurde durch einen Ostwaldschen Zentrifugalheberührer[1]) gerührt, dessen Tourenzahl 120 in der Minute betrug. Den Antrieb leistete ein Elektromotor. Temperaturschwankungen, die in möglichst engen Grenzen gehalten wurden, konnten an einem in den Thermostaten getauchten Beckmannthermometer verfolgt werden. Ein Teil der Messungen wurde bei einer Thermostatentemperatur von 38° C vorgenommen.

Plasma und Serum wurden vor der Anstellung der Messung mehrere Stunden in dünnwandigen Glasflaschen in den Thermostaten gehängt. Dann wurden 25 ccm Plasma in das Pyknometer gegossen; in 15 Minuten glichen sich evtl. Temperaturdifferenzen aus; der Thermometergang wurde von 3 zu 3 Minuten kontrolliert. Dann wurden 25 ccm Serum nachgefüllt und das Capillarrohr aufgesetzt. Um den Meniscus in die Mitte der Capillare zu verlegen, wurde die Flüssigkeit etwas abgesaugt. Bei allen diesen Manipulationen blieb der Pyknometerkörper unter dem Wasserspiegel. Durchschnittlich nach 2 Minuten war die Apparatur so weit zusammengestellt, daß mit der Ablesung am Mikroskop begonnen werden konnte. Alle halben Minuten wurde der Meniscusstand in der Capillare, alle 3 Minuten der Thermometerstand notiert. Ein Kontrollversuch unter analogen Bedingungen im Reagensglas zeigte den Eintritt der Gerinnung an. Die Ablesung wurde bis 5 Minuten nach Eintritt der kompakten Gerinnung fortgesetzt.

Diese Methode hat einige Nachteile. Beim Zusammengießen von Plasma und Serum lassen sich Temperaturdifferenzen nicht vermeiden. Diese gleichen sich erst nach ca. 10 Minuten aus, infolgedessen kommt der Meniscus erst relativ spät zur Ruhe. Es entgehen damit die ersten 10 Minuten der exakten Beobachtung. Es wurde zwar versucht, den Wärmeaustausch dadurch zu beschleunigen, daß dem Pyknometer eine Form gegeben wurde, die ein möglichst günstiges Verhältnis von Ober-

[1]) Ostwald-Luther, Physik.-chem. Messungen. 2. Aufl. S. 99.

Digitized by Google

fläche zu Inhalt bot. Zu dem Zwecke wurden dünnwandige, abgeflachte Pyknometer hergestellt. Die Vorteile dieser neuen Versuchsanordnung waren aber nicht erheblich. Es wurde zwar erreicht, daß sich der Meniscus schon nach 6 Minuten einstellte, aber aktiviertes Serum konnte wegen seiner kurzen Gerinnungszeit doch noch nicht untersucht werden. Und die Zusammendrängung der Reaktion auf eine möglichst kurze Periode ist auch für diese Untersuchungen von großer Wichtigkeit. Dann muß aber eine Vorrichtung getroffen werden, die das Zusammenbringen von Serum und Plasma ermöglicht, ohne daß Temperaturdifferenzen auftreten.

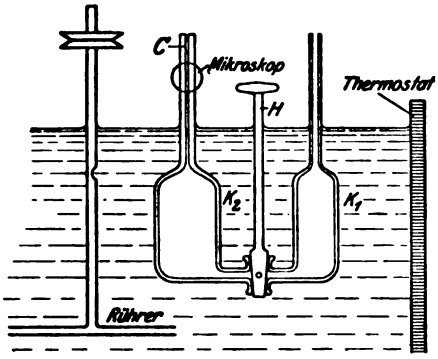


Abb. 1.

Zu diesem Zwecke konstruierten wir folgende einfache Apparatur (s. Abb. 1). Zwei Kolben K_1 und K_2 von 30 und 75 ccm Inhalt sind durch ein Glasrohr miteinander verbunden. Dieses Rohr ist durch einen Hahn H mit langausgezogenem Griff verschließbar. Der größere Kolben läuft nach oben in eine Capillare C von 1 mm Durchmesser, der kleine in ein Glasrohr von 6 mm lichtem Durchmesser aus. Der Apparat taucht in das Thermostatenwasser so weit ein, daß nur die oberen Teile der Steigrohre und des Hahngriffes herausragen.

Der 30-ccm Kolben wird mit aktiviertem Serum, der 75 ccm Kolben zu $^2/_3$ mit Plasma gefüllt; dann wird der Apparat in den Thermostaten versenkt. Rührung, Ablesung usw. erfolgen in prinzipiell gleicher Weise wie bei der schon beschriebenen Versuchsanordnung. Nach 30 Minuten wird der Hahn geöffnet und das Serum in den großen Kolben durch Luftdruck hinübergepreßt, bis die Flüssigkeitssäule der Capillare in dem Gesichtsfeld des Ablesemikroskopes erscheint. Dann wird der Hahn geschlossen und mit der Ablesung begonnen.

Versuchsergebnisse.

Es wurden im ganzen 65 Messungen angestellt, davon 21 mit dem 50-ccm-Pyknometer, 5 mit einem flachen 100-ccm-Pyknometer, 2 mit einem flachen 10-ccm-Pyknometer und 37 mit dem zuletzt beschriebenen Apparat. Am genauesten gestalteten sich die Messungen mit aktiviertem Serum in der eigens zu diesem Zwecke konstruierten Apparatur. Die Gerinnungsdauer betrug hierbei 1,5—2 Minuten und die Ablesung währte ca. 15 Minuten. Während dieser Zeit konnte die Temperatur des Thermostatenwassers bis auf 0,001° C konstant gehalten werden. Brauchbar

Digitized by Google

waren auch die Messungen im 50-ccm-Pyknometer; die Gerinnungszeit betrug hier 25—40 Minuten. Die Ablesung wurde 50 Minuten lang durchgeführt. In dieser Zeit schwankte die Thermostatentemperatur um 0,006° C.

Aus den Kohlrauschschen Tabellen[1]) ergibt sich, daß die Volumenänderung, die 1 g Wasser in einem Glasgefäß pro 1 ° Temperaturerhöhung aufweisen würde, im Bereich von 15°—20° 0,00015 beträgt. Falls man den Ausdehnungskoeffizienten des Plasmas bzw. des Serums dem des Wassers gleich setzen darf, was wohl annähernd zulässig ist, so hätten wir also in dem 50 ccm fassenden Pyknometer bei einer Erwärmung des Thermostaten um beispielsweise 0,01° eine Volumzunahme um 0,000075 zu erwarten.

Nun entspricht 100 Teilstrichen des Okularmikrometers eine Flüssigkeitssäule von $0{,}5 \cdot 0{,}5 \cdot 3{,}142 \cdot 4$ cmm = 3,142 cmm = 0,003142 ccm, also einem Teilstrich 0,000031 ccm. Da eine Temperaturerhöhung um 0,01° einer Volumenzunahme um 0,000075 ccm entspricht, so wird sich der Flüssigkeitsmeniscus um 2,4 Teilstriche verschieben.

Bei den Messungen am 50-ccm-Pyknometer wurde die Temperatur bis auf höchstens 0,006° Unterschied von Beginn bis zum Ende der Messung konstant gehalten; das entspricht 1,4 Teilstrichen. Temperaturänderungen konnten also bei unseren Versuchen im Stande des Meniscus eine Differenz bis zu 1,4 Teilstrichen bedingen.

Aus den mitgeteilten Versuchstabellen ist ersichtlich, daß die tatsächlich beobachteten Meniscusschwankungen diese Grenze nicht überschreiten.

Was die Empfindlichkeit der Methode anbetrifft, so haben wir die Möglichkeit, noch Volumenänderungen im Verhältnis 1 : 160000 zu erkennen. Noch günstiger gestalten sich die Verhältnisse bei der zuletzt besprochenen Apparatur, bei der noch Volumenänderungen im Verhältnis 1 : 2 400 000 erkennbar sind.

Aus diesen Versuchen ergab sich übereinstimmend, daß eine meßbare Veränderung des Volumens während der Blutgerinnung nicht eintritt. 2 Protokolle werden zur Erläuterung beigegeben (Apparatur Abb. 1).

Protokoll I.

Uhr	Meniscus	Thermostatentemperatur
6^h 15′	—	3,2810
6^h 18′	—	3,2810
6^h 21′	Hahn eröffnet	3,2810
	88,5	
	89,0	
	89,0	

[1]) Kohlrausch, Lehrbuch der Prakt. Physik, S. 700.

Digitized by Google

Uhr	Meniscus	T	mostatentemperatur	
	89,5			
	89,5			
6h 24′	89,5		3,2810	
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			Beginn der Gerinnung 6h 23′;
6h 27′	89,5		3,2815	Temperaturänderung des
	89,5			Thermostaten: 0,001° C. Ver-
	89,5			schiebung des Meniscus +
	89,5			1 Teilstrich.
	89,5			
	89,5			
6h 30′	89,5		3,2820	
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			
6h 33′	89,5		3,2820	
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			
	89,5			
6h 36′	89,5		3,2820	
	89,5			

Protokoll II.

Uhr	Meniscus	Thermostatentemperatur	
10h 00′	—	3,8850	
10h 03′	—	3,8850	
10h 06′	—	3,8850	
	Hahn geöffnet		
	12,5		
	12,0		
	12,0		
	12,0		
	12,0		
10h 09′	12,0	3,8850	Beginn der Gerinnung 10h 07′;
	12,0		Temperaturänderung des
	12,0		Thermostaten von Beginn bis
	12,0		zu Ende des Versuchs: 0,001 °C.
	12,0		Unterschied im Stand des
	12,0		Meniscus: — 1 Teilstrich.

Digitized by Google

Uhr	Meniscus	Thermostatentemperatur
10h 12′	12,0	3,8850
	12,0	
	12,0	
	12,0	
	12,0	
	11,5	
10h 15′	11,5	3,8845
	11,5	
	11,5	
	11,5	
	11,5	
	11,5	
10h 18′	11,5	3,8845
	11,5	
	11,5	
	11,5	
	11,5	
	11,5	
10h 21′	11,5	3,8845

III. Findet bei der Blutgerinnung eine Änderung der elektrischen Leitfähigkeit statt?

Aus den Ergebnissen des ersten und zweiten Teiles dieser Arbeit folgt mit einem gewissen Grade von Wahrscheinlichkeit, daß chemische Prozesse bei der Gerinnung keine wesentliche Rolle spielen. Wenn auch in dem Fehlen einer meßbaren Wärmetönung oder evtl. in dem Bestehen einer solchen Wärmetönung, wie sie für die Sol-Gelumwandlung der Kieselsäure usw. bekannt ist, und wenn auch weiter in dem Fehlen einer Volumenänderung noch kein Beweis dafür erblickt werden kann, daß chemische Reaktionen mit Sicherheit auszuschließen sind, so ist doch bei unseren heutigen Kenntnissen über den Sol- und Gelzustand deren Existenz in Frage gestellt. In der Messung der elektrischen Leitfähigkeit bietet sich uns nun eine weitere Untersuchungsmöglichkeit dar, deren Resultate zwar auch nur in negativem Sinne Verwertung finden können.

Nach Arrhenius[1]) wird die Leitfähigkeit eines Elektrolyten durch Gegenwart eines Nichtelektrolyten beeinträchtigt. In

[1]) Arrhenius, Über die Änderung des elektrischen Leitvermögens einer Lösung durch Zusatz von kleinen Mengen eines Nichtleiters. Zeitschrift f. physik. Chemie 1892, S. 9.

Digitized by Google

Körperflüssigkeiten ist, wie Bugarski und Tangl[1]) gezeigt haben, die geringere Dissoziationsfähigkeit durch den Eiweißgehalt bedingt. Wenn diese Substanzen eine chemische Änderung eingehen, so wäre es wohl denkbar, daß sich dieser chemische Vorgang in einer Veränderung der Leitfähigkeit der Elektrolytlösung äußert.

Die molekulare Leitfähigkeit hängt nun aber lediglich von der Zahl der Ionen und deren Geschwindigkeit ab. Diese Geschwindigkeit ist aber abhängig von dem Widerstand, den die Flüssigkeit der Bewegung der Ionen entgegensetzt, also auch von dem Grade der Viscosität. Da wohl anzunehmen ist, daß bei der Gerinnung Viscositätsänderungen auftreten, so wäre theoretisch eine Änderung der Leitfähigkeit während des Gerinnungsvorganges auch dann zu erwarten, wenn keine chemischen Prozesse eine Widerstandsänderung hervorrufen. Groß werden aber diese Änderungen kaum sein, da in den Hohlräumen des Gels die ursprüngliche Viscosität erhalten bleibt. Was nun die Diffusibilität in Gelen betrifft, so ist bekannt, daß „in verdünnten Gelen die Diffusionskonstante nur wenig durch die Gegenwart des Gelgerüstes beeinflußt wird[2])".

Die Frage nach einer elektrischen Leitfähigkeitsänderung während der Blutgerinnung wurde bisher mehrfach geprüft, und zwar mit wechselnden Ergebnissen. Frank[3]) fand bei Messungen an Oxalatblut keine konstante oder bestimmbare Änderung.

Bayliss[4]) führte seine Versuche an Vollblut aus und fand eine Verminderung der Leitfähigkeit um 18,5%; umgekehrt beobachtete er bei der Milchgerinnung den entgegengesetzten Vorgang. Dem widersprechen Befunde von Wilson[5]) und Calugareanu[6]), die beide an körperchenfreiem Material maßen. Sie führten die von Bayliss angegebene Änderung um 18,5%

[1]) Bugarski und Tangl, Physikalisch-chem. Untersuchungen über die molekularen Konzentrationsverhältnisse des Blutserums. Arch. f. d. ges. Physiol. **72**, 540. 1898.

[2]) Freundlich, Capillarchemie, S. 515.

[3]) Frank, A note on the electric conductivity of blood during coagulation. Americ. Journ. of physiol. **14**, 466.

[4]) Bayliss, Biochemical Journ. **1**, 175. 1906.

[5]) Wilson, The conductivity of blood in coagulation. Biochemical Journ. **2**, 377. 1907.

[6]) Calugareanu, Conductivité du plasma sanguin, du plasma musculaire et du lait pendant la coagulation. Compt. rend. de la soc. de biol. **65**, 698. 1908.

Digitized by Google

darauf zurück, daß sich die roten Blutkörperchen senken und an die Elektrodenflächen anlagern. Samoljoff[1]) fand in einer ersten Reihe von Experimenten an körperwarmem Vollblut eine Verminderung der Leitfähigkeit, die sich über die ganze Messung erstreckte und sich unabhängig vom Zeitpunkte der Gerinnung erwies. Eine zweite Reihe von Experimenten mit Oxalatplasma ergab Konstanz der Leitfähigkeit.

Es erscheint also notwendig, im Rahmen dieser Arbeit obige Resultate einer erneuten Prüfung zu unterziehen.

Beschreibung der Apparatur.

Verwandt wurde die Kohlrauschsche Leitfähigkeitsmethode. Das Leitfähigkeitsgefäß hatte eine Widerstandskapazität von C = 1,13. Es tauchte in einem 1,5 l Wasser fassenden Thermostaten ein. Auf genaue Temperaturkonstanz wurde geachtet. Das Material wurde auch hier mehrere Stunden vor der Messung in Vorratsflaschen in Thermostaten aufbewahrt. Zur Verbesserung des Tonminimums wurde dem großen Vergleichswiderstand eine abstufbare Kapazität parallel geschaltet. Als Brücke fand eine sog. Walzenbrücke von 3 m Drahtlänge Verwendung. Sämtliche Vorsichtsmaßregeln, die diese Methode erheischt, wurden berücksichtigt. Vor allem wurde darauf geachtet, daß der Wechselstrom nicht zu lange Zeit durch das Leitfähigkeitsgefäß hindurchging. Es erwies sich fernerhin als zweckmäßig, die Messungen mit unaktiviertem oder nur schwach aktiviertem Serum auszuführen.

Versuchsergebnisse.

Es wurden 42 Messungen an Serum + Plasma angestellt. Wir erhielten regelmäßig das Resultat, daß bei der Blutgerinnung keine meßbare Änderung der Leitfähigkeit eintritt. Herrn Geheimrat Bleibtreu danken wir ergebenst für die bewährten Ratschläge.

Zusammenfassung.

Der Vorgang der Blutgerinnung ist mit keiner meßbaren Wärmetönung verknüpft. Berücksichtigt man aber den geringen Fibrinogengehalt des untersuchten Plasmas und wertet man die Empfindlichkeit der calorimetrischen Apparatur aus, so folgt, daß eine Wärmetönung bei der Gerinnung nicht ausgeschlossen ist. Sie müßte pro Gramm Fibrinogen unter 1,5 cal. liegen. Änderungen des Volumens und der elektrischen Leitfähigkeit konnten während der Blutgerinnung ebenfalls nicht beobachtet werden.

[1]) Samoljoff, Thèse de doctorate. Sciences Paris 1908, S. 50. Über den Einfluß der Gerinnung des Blutes auf die Leitfähigkeit desselben. Diese Zeitschr. **11**, 210. 1908.

Digitized by Google

Colorimetrische Phenolbestimmung im Harn[1]).

Von

M. Weiß (Wien-Gleichenberg).

(Eingegangen am 22. Juli 1920.)

Obgleich die Phenolbestimmung im Harn ein seit Jahrzehnten geübtes Verfahren der physiologischen Chemie darstellt, ist die Technik derselben noch immer keine einheitliche. Praktische und theoretische Einwände stellen sich den ausgezeichneten Methoden von Kossler und Penny[2]), von Neuberg[3]) und von Mooser[4]) entgegen, welche vielleicht bewirkt haben, daß die doch manches interessante Problem berührende Phenolausscheidung im Harne in der letzten Zeit weniger verfolgt wurde. Die quantitative Bestimmung der Phenole im Harn ist, nach welcher Methode immer wir heute arbeiten, mit einem bedeutenden Zeitaufwand verbunden. Daher hielt ich den Versuch der Mühe wert, mein[5]) relativ einfaches Verfahren der Tyrosinbestimmung mittels der Millonschen Reaktion auch auf den Harn für die Bestimmung der Phenole anzuwenden.

Das Prinzip des Verfahrens ist die colorimetrische Auswertung der Millonschen Probe.

Zu 3 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit kommen 2 ccm einer Lösung von 5 g Hydrarg. oxydatum sulfur. in 100 ccm 5 volumproz. H_2SO_4[6]) in einem graduierten Röhrchen hinzu, dann wird über einer nicht zu starken Flamme (Spiritusbrenner) bis gerade zum Sieden erhitzt, einige Augen-

[1]) Subventioniert von der Fürst Liechtensteinschen Stiftung.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **17**, 117. 1892.

[3]) Der Harn **1**, 465. 1911 und Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 123. 1899.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **63**. 1909. Liechti u. Mooser, Zeitschr. f. physiol. Chemie **73**, 368. 1912. M. Hensel, Zeitschr. f. physiol. Chemie **78**, 373. 1913. Neuberg u. Hildesheimer, diese Zeitschr. **28**, 525. 1910.

[5]) Diese Zeitschr. **97**, 170. 1919.

[6]) Die Konzentration dieser Lösung ist gegen früher etwas abgeändert.

Digitized by Google

blicke abgewartet, bis keine Gasblasen mehr aufsteigen und hierauf werden aus einem Tropffläschchen 3 Tropfen einer $^1/_2$proz. $NaNO_2$-Lösung hinzugefügt. Bei Anwesenheit von in den Kreis der Millonschen Reaktion fallenden Substanzen (Phenol, Parakresol, Oxysäuren, Tyrosin u. a.) entsteht eine distinkte Rotfärbung, welche innerhalb von 3 Min. ihr Maximum erreicht und etwa $^1/_2$ Stunde sich unverändert erhält. Die in dieser Weise mit einer Tyrosinlösung 1 : 50 000 angestellte Probe ist ganz frei von Trübungen oder Niederschlägen und gilt als Standardprobe. Alle Bestimmungen werden unter Heranziehung dieser Standardprobe zum colorimetrischen Vergleich vorgenommen, indem die Verdünnung der zu prüfenden Flüssigkeit soweit getrieben wird, bis die Intensität der mit der letzten Verdünnung in der gleichen Weise angestellten Millonschen Reaktion gleich oder annähernd gleich ist der Standardprobe. Ist nicht gleiche Intensität vorhanden, dann kann man innerhalb kleiner Grenzen (bis zu etwa zweimaliger Verdünnung) durch Vergleich im Colorimeter oder, wie ich mich überzeugt habe, auch ebensogut durch Verdünnung der Proben mit Wasser in gleich tiefen Röhrchen den Tyrosinwert bestimmen. Die erste Probe mit der zu untersuchenden Flüssigkeit ist eine blinde, orientierende. Ist die Intensität, wie in der Regel, viel stärker als die der Standardlösung, so bestimmt man ungefähr durch Verdünnung, wievielmal stärker die Millonsche Probe ist, um dann, wenn z. B. 5 malige Verdünnung approximativ der Standardprobe entspricht, mit der 5 maligen Verdünnung der Ausgangsflüssigkeit wieder die Millonsche Reaktion in der gleichen Weise anzustellen usw. Gewöhnlich wird man mit der aus der Intensität der Millonprobe gewonnenen Verdünnungszahl noch nicht die richtige Verdünnung treffen, weil die Millonsche Probe nicht parallel der Konzentration des Tyrosins (od. anderer Phenole) ausfällt, sondern schwächer. Erst in der Verdünnungsbreite, welche 1 : 50 000 Tyrosin entspricht, sind die angewendeten Reagensmengen genügend, um das Maximum an Färbung zu ergeben.

Mit reiner Tyrosinlösung erhält man bei der Standardprobe eine absolut klare Flüssigkeit, dagegen geben Eiweißhydrolysate und Harnflüssigkeiten immer Niederschlag. Von diesem oder einer Trübung wird immer abfiltriert, jedoch erst nach dem Zusatz des $NaNO_2$ und nach Verlauf der vorgeschriebenen 3 Minuten.

Dieses für das Tyrosin erprobte Verfahren mußte für den Harn modifiziert werden, weil im Harne die reagierenden Phenole nicht frei, sondern gebunden an Schwefel- oder Glucuronsäure enthalten sind, und weil die Phenole im Gegensatz zum Tyrosin flüchtig sind. Die obenerwähnte 5proz. Hg-Sulfatlösung in 5 Vol.-proz. H_2SO_4 ergibt beim Hinzufügen zu 3 ccm Flüssigkeit eine ungefähr 5 Gew.-proz. H_2SO_4-Lösung, welche zur Hydrolyse der Phenolverbindungen genügt. Es konnte daher erwartet werden, daß beim Kochen der Probe mit einem Rückflußkühler oder, wie ich es später getan habe, mit einem 1 m-Steigrohr inner-

Digitized by Google

halb kurzer Zeit die Phenole nachweisbar würden. Dies war in der Tat so. Schon nach etwa 5 Minuten dauerndem Kochen in einer mit Steigrohr versehenen Epruvette (am besten wieder mit Spiritusbrenner) waren Phenole nachweisbar und nach $^1/_4$stündiger Hydrolyse war die Zerlegung vollendet. Auf diese Weise ließ sich in jedem Harne eine mehr oder weniger starke Millonsche Reaktion nachweisen, welche vorher nicht vorhanden war. Noch reiner und schöner trat diese Reaktion hervor, wenn man den normalen Harn einige Male vorher verdünnte und dann erst die Hydrolyse vornahm.

Zur quantitativen Bestimmung der Phenole im Harn habe ich zunächst einen blinden Versuch mit in der Regel schon einige Male (2—5 mal) verdünntem Harn gemacht und bin dann auf Grund der mit dieser Verdünnung nach der Hydrolyse erhaltenen Millonschen Probe weiter nach den früheren Angaben vorgegangen.

Das Verfahren der quantitativen Bestimmung der Phenole im Harn gestaltet sich daher folgendermaßen: Man verdünnt den nativen Harn (bei Eiweißgegenwart nach Ausfällung mit wenig Barytwasser und Notierung der hierdurch entstandenen Verdünnung) 2—5 mal mit gewöhnlichem Wasser, (füllt am besten mittels Pipette) 3 ccm der Verdünnung in ein graduiertes Röhrchen (von denen man sich mehrere gleich tiefe vorrätig hält), fügt 2 ccm der Hg-Sulfatlösung hinzu, gibt einen Gummistopfen mit einem kleinen Kühler oder einem 1 m-Steigrohr darauf, klemmt das Ganze ein und erhitzt durch $^1/_4$ Stunde mit einem Spiritusbrenner, wobei die Flüssigkeit in gleichmäßigem Kochen ohne Stoßen zu erhalten ist, was man durch Heben und Senken des Röhrchens in der Klemme erreicht. Nach $^1/_4$ Stunde stellt man den Brenner beiseite und läßt noch, was im Destillierrohr ist, abtropfen. Inzwischen hat die Flüssigkeit aufgehört zu sieden, und man fügt, nachdem man den Gummistopfen abgenommen hat, sofort die 3 Tropfen $NaNO_2$ hinzu. Auf die Trübung der Flüssigkeit wird zunächst keine Rücksicht genommen. Erst nach 3 Minuten, innerhalb deren die Millonsche Reaktion das Maximum ihrer Intensität erreicht hat, filtriert man durch ein kleines Filterchen bis zur völligen Klarheit. Vor dem Abschluß der Hydrolyse hat man sich mit der Standardtyrosinlösung die Millonsche Probe vorbereitet, so daß man sofort vergleichen kann. Liegt die Intensität der Probe im Bereiche der Standardprobe, d. h. ist sie

Digitized by Google

höchstens 2 mal so stark oder 2 mal so schwach, dann kann man direkt den Wert bestimmen, ist aber, wie nicht selten, die Intensität viel stärker, dann muß man mit einer neuerlichen, der Intensität der Probe entsprechenden Verdünnung die Hydrolyse wiederholen und in gleicher Weise verfahren. In der Regel wird eine Bestimmung, wenn man sich die Apparatur zweckmäßig hergerichtet hat, kaum länger als $^1/_2$ Stunde in Anspruch nehmen.

Z. B. 1. Tagesmenge eines Normalharnes 1200 ccm. 5 ccm wurden 5 mal verdünnt. Zu 3 ccm dieser Verdünnung kamen 2 ccm Hg-Sulfatlösung. Diese Flüssigkeit wurde $^1/_4$ Stunde hydrolysiert und in der beschriebenen Weise die Probe schließlich angestellt. Es ergab sich, daß die 5 malige Verdünnung eine genau gleich starke Millonsche Reaktion zeigt wie die Standardtyrosinlösung 1 : 50 000. Der in Tyrosin ausgedrückte Phenolwert pro die beträgt daher:

$$x = \frac{1200 \cdot 5 \cdot 1}{50\,000} = 0{,}120$$

2. Carc. recti. Tagesmenge 600 ccm. Die 5 malige Verdünnung ergab nach der Hydrolyse eine Millonreaktion, die etwa 6 mal so stark war als die Standardprobe. Es wurde nun mit der 30fachen Verdünnung hydrolysiert und wieder geprüft. Die Millonsche Reaktion war noch stärker als die Standardprobe, und zwar mußte die Probe der 30fachen Verdünnung von 4,5—7 verdünnt werden, um gleiche Intensität zu erhalten.

$$\text{Der Tyrosinwert } x = \frac{600 \cdot 30 \cdot 7 \cdot 1}{4{,}5 \;\; 50\,000} = 0{,}560\,.$$

3. Diabetes mellitus. Tagesmenge 3500 ccm. Die 2fache Verdünnung ergab nach der Hydrolyse usw. eine Millonsche Reaktion, die schwächer war als die Standardprobe und zwar mußte diese von 5 auf 8 verdünnt werden bis zur Farbengleichheit.

$$x = \frac{3500 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 1}{8 \;\; 50\,000} = 0{,}087\,.$$

Das Verfahren wurde mehrfach auf seine Verläßlichkeit durch Kontrollproben geprüft.

1. Mein eigener Harn. Tagesmenge 1000 ccm ergab 0,120 als Tyrosinwert der Phenole. Zu 20 ccm des nativen Harnes wurden 2 ccm einer 1promill. p-Kresollösung, enthaltend 0,002 p-Kresol = 0,0033 Tyrosin (Mol.-Gew. des Kresols: Mol.-Gew. des Tyrosins = 108 : 181) hinzugefügt und der Tyrosinwert wieder in obiger Weise bestimmt. Es wurden gefunden 0,0054, berechnet 0,0024 + 0,0033 = 0,0057.

2. Tumor abdominis. Tagesmenge 1000 ccm. Die 12fache Verdünnung ergab den Wert von 0,382, die 18fache 0,390 pro die.

3. Lobuläre Pneumonie. Tagesmenge des Harnes 1200 ccm. Der Originalharn ergab pro die den Wert von 0,320. Die Fraktion I aus 160 ccm (s. diese Zeitschr. **102**, 228) gab keine Millonsche Probe. Die Fraktion II mit Natriumphosphat gelöst = 58 ccm gab bei 25facher Verdünnung einen

Digitized by Google

Millon, welcher $^1/_2$ so stark war als die Standardprobe. Der Tyrosinwert der Phenole in der Fraktion II $x = \frac{1200 \cdot 58 \cdot 25 \cdot 1}{160 \cdot 2 \cdot 50000} = 0{,}109$. Von diesen 58 ccm wurden 20 mit Ammonsulfat ausgesalzen, das Filtrat betrug 32 ccm. Die 10fache Verdünnung ergab[1]) einen Millon, der gegenüber der Standardprobe schwächer war, und zwar im Verhältnis von 5 : 6,4. Tyrosinwert $x = \frac{1200 \cdot 58 \cdot 32 \cdot 5 \cdot 10 \cdot 1}{160 \cdot 20 \cdot 6{,}4 \cdot 50000} = 0{,}108$. Die Fraktion III enthielt 0,206. Die Summe der drei Fraktionen, welche zusammen dem Originalharn entsprechen, ergab somit: $0 + 0{,}109(0{,}108) + 0{,}206 = 0{,}315(0{,}314)$ gegenüber 0,320 im Originalharne.

4. Ikterus gravis. Totaler Gallengangsverschluß. Tagesmenge des Harns 500 ccm. Die 20fache Verdünnung ergab Millon $= \frac{7{,}5}{5}$ der Standardprobe = 0,300 Tyrosin. Der mit $CHCl_3$ konservierte Harn wurde in Unkenntnis des früheren Wertes 5 Wochen später wieder untersucht und ergab bei 30facher Verdünnung genau gleiche Intensität des Millon wie die Standardlösung. Tyrosinwert daher wieder 0,300.

5. Tumor abdom. Tagesharn 1600 ccm. Tyrosinwert der Phenole pro die = 0,380. Von diesem Harn wurden 100 ccm mit 2 ccm konz. H_2SO_4 versetzt und unter zweimaligem Nachgießen von Wasser am absteigenden Kühler destilliert. Das Destillat (wasserfarben) = 190 ccm ergab bei 5facher Verdünnung und Vornahme der Probe wie mit reinem Tyrosin (nur mit Rückfluß) genau gleiche Probe wie die Standardlösung. Ihr Tyrosinwert $x = \frac{1600 \cdot 190 \cdot 5 \cdot 1}{100 \cdot 50000} = 0{,}304$. Der Rückstand im Kolben ergab im abgedunsteten und wieder in Wasser gelösten Ätherextrakte einen Tyrosinwert von 0,055. Daher wurden von 0,380 wiedergefunden

im Destillat	0,304
im Rückstand (ätherlösliche Phenolderivate) . .	0,055
zusammen	0,359

6. In einem anderen Falle wurden von 0,240 im zweimaligen Destillat wieder gefunden 0,171.

7. Mischung verschiedener diazopositiver Harne. Durchschnittstagesmenge 800 ccm.

θ Alb. Gesamttyrosinwert p. d.	0,240
Fraktion I	θ
Fraktion II	0,093
Fraktion III	0,144
Summe:	0,237

Bei der Bestimmung der Phenole auf die beschriebene Art wurde keine besondere Rücksicht auf die Oxysäuren genommen.

[1]) Bei starkem Ammonsulfatgehalt wie bei der Sättigung stört der Salzgehalt, wie auch mitunter starker Zuckergehalt bei Diabetes mellitus. Erst die mehrfache Verdünnung schaltet diese Störungen aus.

Digitized by Google

Nach den spärlichen Angaben der Literatur hierüber beträgt die Menge derselben p. d. 15—25 mg. Durch einige Bestimmungen im zweimaligen Ätherextrakt des angesäuerten Harnes konnte ich ähnliche Werte für die Norm feststellen. Beim Carcinom des Digestionstraktus scheint parallel mit einem erhöhten Phenolwert auch die Menge der Oxysäuren vermehrt zu sein, wie ja schon Baumann einen Parallelismus zwischen Oxysäuren- und Phenolausscheidung festgestellt hat. Es dürfte daher berechtigt sein, diesen sicher nicht großen Wert, der auf die Oxysäuren entfällt, unter den Phenolwert zu subsummieren.

Dieser Phenolwert, den ich als Tyrosin berechne, ist somit (wie auch bei den früheren Bestimmungsverfahren) kein einheitlicher. Es sind darin bei meinem Verfahren außer Phenol und p-Kresol auch noch die Oxysäuren inbegriffen. Für das Vorhandensein anderer Oxyphenylderivate, wie z. B. Tyrosin selbst, ergab sich bisher kein Anhaltspunkt. Wenigstens konnte im Bleiacetatniederschlag bei saurer Reaktion, im Ammonsulfatniederschlag und im Barytniederschlag bei eiweißfreien Harnen kein Millon nachgewiesen werden. Jedoch wäre die von mir sogenannte Fraktion II (l. c.) in dieser Richtung noch einer genaueren Analyse, insbesondere in pathologischen Fällen, zu unterziehen. Akute gelbe Leberatrophie und Phosphorvergiftung, bei welchen ja Tyrosin im Harne ausgeschieden wird, habe ich nicht untersucht.

Tyrosin hat das Molekulargewicht 181, p-Kresol 108, Phenol 94. Der Tyrosinwert würde daher in p-Kresol ausgedrückt mit $\frac{108}{181}$, in Phenol mit $\frac{94}{181}$ zu multiplizieren sein.

Obzwar die Ergebnisse meiner Phenolbestimmungen noch in einer besonderen Arbeit veröffentlicht werden sollen, so will ich doch, weil von allgemeinem Interesse, auf diese Verhältnisse schon hier kurz eingehen. Im großen ganzen habe ich Übereinstimmung mit den Ergebnissen der früher auf anderem Wege erhaltenen Resultate gefunden. Schon normalerweise kann bei verschiedenen Individuen die Phenolausscheidung sehr verschieden sein. Ich erhielt (inkl. Oxysäuren) in der Norm Werte von 0,050—0,200, selten darüber. Ein Durchschnittswert läßt sich nicht mit Sicherheit angeben. Bei ein und demselben gesunden Individuum ist bei gleicher Kost eine große Konstanz des Wertes zu bemerken. Der Zustand des Darmes, ob Obstipation oder

Digitized by Google

Diarrhöe, ist sicher von Einfluß auf die Phenolausscheidung. Es liegen die Verhältnisse beim Phenol ähnlich wie bei der Bildung des Chromogens des Uroroseins (Indolessigsäure und ihre Verbindungen) und verweise ich auf eine das Urorosein betreffende Arbeit[1]). Bei Diabetikern habe ich einen Einfluß der Kost insofern feststellen können, als der Wert bei Gemüsekost etwas höher war. Wie schon Neuberg[2]) hervorhebt, liegt kein Grund vor, die besonders hohen Phenolwerte der Literatur beim Diabetes als richtig anzusehen. Er betont, daß bei dem titrimetrischen Verfahren nach Kossler und Penny aus dem Zucker entstandene keton- und aldehydartige Substanzen, welche auch Jod binden, so hohe Werte bewirken. In meinen mehrere Diabetesfälle verschiedener Art betreffenden Untersuchungen fand ich eher subnormale Werte, welche selten über 0,100 hinausgingen.

Bei Krankheiten habe ich übereinstimmend mit Lewin[3]) u. A. beim Carcinom, und zwar überwiegend des Digestionstraktus hohe Phenolwerte gefunden. Werte von 0,600 gegenüber etwa 0,150 in der Norm sind nichts seltenes in diesen Fällen. Aber auch die Tuberkulose des Darmes geht, wie ich in Übereinstimmung mit Blumenthal[4]) feststellen konnte, mit hoher Phenolausscheidung einher.

Für die differentialdiagnostische Verwertung der Phenolausscheidung halte ich es zunächst für das wichtigste, gewissermaßen einen Standardwert bei einer bestimmten Kost, am besten Milchdiät, bei Gesunden festzustellen. Leider machten es mir die gegenwärtigen Verhältnisse unmöglich, dies durchzuführen. Weiterhin ist 1 Tag vor der 24stündigen Harnsammlung für Darmentleerung zu sorgen, um die etwa aus einer Obstipation stammenden Fehlerquellen zu beseitigen. Erst dann kann die Phenolbestimmung für die Differentialdiagnose Wert erlangen. Vor allem glaube ich, daß die mitunter enorm hohen Phenolwerte, die ich schon jetzt bis zum Vierfachen des Normalen ansteigen gesehen habe, beim Carcinom des Digestionstraktus und bei Tuberkulose des Darmes eine gewisse differenzielle Bedeutung erlangen könnten, indem in einem unklaren Fall ein auffallend hoher Phenolwert im Harn den Gedanken an einen abnormen Gewebszerfall nahelegen muß.

---

[1]) Weiss und Smieczuszewsky, Wien. klin. Wochenschr. 1912, 52.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **27**, 123. 1899.

[3]) Festschr. f. Salkowski, Berlin, 1903.

[4]) Handbuch der spez. Pathol. d. Harnes. Urban u. Schwarzenberg. 1913.

Digitized by Google

Daß Medikamente, die selbst zu einer Millonschen Reaktion Anlaß geben könnten, ausgeschaltet werden müssen, versteht sich von selbst.

Zusammenfassung.

1. Die von mir beschriebene colorimetrische Tyrosinbestimmung läßt sich auch auf den Harn zur Bestimmung der in ihm enthaltenen Oxyphenylderivate anwenden.

2. Bei Krankheiten gibt besonders geschwüriger Zerfall im Digestionstrakte zur erhöhten Phenolausscheidung Anlaß.

3. Eine differentialdiagnostische Verwertung der erhöhten Phenolausscheidung im Harne erscheint unter klarer Erkenntnis ihrer Genese aus zerfallendem Eiweiß möglich.

Digitized by Google

Untersuchungen über den Einfluß von Temperaturen auf Fermente, besonders von Lab und Pepsin.

Von
Adolf König.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 22. Juli 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Einfluß der Temperatur auf das Labferment allein bei der Milchgerinnung.

1. Material und Versuchsanordnung.

1. Die Milch: Da die Versuche immer am Nachmittage ausgeführt wurden, so verwendete ich stets frische, abgekühlte Morgenmilch.

2. Das Labferment wurde in 2 verschiedenen Präparaten verwendet:

a) Die Labtabletten à 1 g kamen in den Vorversuchen zur Anwendung. Da sie aber in kaltem Wasser nicht so leicht löslich sind, waren sie für die Versuche, wo verschiedene Temperaturen auf die wässerige Lablösung einwirken, nicht vorteilhaft.

b) Das Labextrakt, hergestellt von Baumgartner & Co in Zürich, leistete uns sehr gute Dienste; es hat vor allem den Vorteil, daß es beliebig mit Wasser verdünnt werden kann. Zudem bleibt darin die gerinnungserregende Wirkung des Labfermentes längere Zeit konstant, wenn es im Eisschranke aufgestellt wird.

3. Allgemeine Versuchsmethode: Mehrere trockene, gleichgroße Reagensgläser werden je mit gleicher Menge Milch beschickt; hierauf stellt man die Gläschen in einem Drahtkorb in kaltes Leitungswasser, damit die Milch gleichmäßig abgekühlt werde. Das Labextrakt wird stets 100fach mit Wasser verdünnt; nachher gibt man in jedes Röhrchen die gewünschte Menge dieser verdünnten Lablösung und wiegt die Gläschen hin und her, damit sich das Lab mit der Milch gut vermischt. Sind alle Röhrchen auf diese Weise vorbereitet, so stellt man den Drahtkorb in ein Wasserbad mit der Temperatur, bei der die Gerinnung vorgenom-

Digitized by Google

men werden soll. Auf diese Weise ist es uns möglich, daß in allen Gläschen mit Milch + Lab die gerinnungserregende Wirkung des Labfermentes zu genau der gleichen Zeit einsetzt.

4. Die Gerinnungsintensität: Um den Eintritt der vollständigen Gerinnung genau zeitlich feststellen zu können, muß man die Röhrchen im Wasserbade von Zeit zu Zeit vorsichtig hin- und herneigen. Nur so ist es möglich, daß man den Zeitpunkt genau notieren kann, wo in jedem Röhrchen der Inhalt gallertartig erstarrt.

5. Gerinnungszeit: Die folgenden Tabellen geben die Zeit bis zur vollständigen Gerinnung in Minuten an.

6. Abänderungen in der Versuchsmethode und Beeinflußung des Labfermentes werden in den einzelnen Versuchen besprochen.

7. Aus den zahlreichen Versuchen werde ich nur diejenigen besprechen, die für die Entwicklung der ganzen Arbeit und für die Schlußresultate Bedeutung haben.

2. Eigene Versuche.

I. Vorversuch: Das Labferment kommt in Form von Labtabletten zur Anwendung. In eine Anzahl Reagenzgläschen kommen je 5 ccm Milch, dazu gebe ich steigende Mengen der Lablösung. Die Gerinnung wird bei 35° C vorgenommen. Lablösung: 0,2 g einer Labtablette werden in 100 ccm frischem Leitungswasser gelöst.

Nr.	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen der Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	5	0,02	3h 00′	3h 48′	48
2	5	0,02	3h 00′	3h 48′	48
3	5	0,04	3h 00′	3h 43′	43
4	5	0,04	3h 00′	3h 43′	43
5	5	0,06	3h 03′	3h 41′	38
6	5	0,06	3h 03′	3h 41′	38
7	5	0,08	3h 33′	4h 07½′	34½
8	5	0,08	3h 33′	4h 07½′	34½
9	5	0,1	3h 40′	4h 09′	29
10	5	0,1	3h 40′	4h 02′	29
11	5	0,15	3h 50′	4h 10′	20
12	5	0,15	3h 50′	4h 10′	20
13	5	0,2	4h 00′	4h 15′	15
14	5	0,2	4h 00′	4h 15′	15

II. Vorversuch: Hier soll die Wirkungsstärke des Labextraktes ausprobiert werden. In eine Anzahl Reagenzgläschen bringen wir je 5 ccm Milch, dazu kommen steigende Mengen der 100fach verdünnten Lablösung. Die Gerinnung erfolgt in einem Wasserbade bei 35° C.

Lablösung: 0,2 ccm Labextrakt + 20 ccm Wasser.

Digitized by Google

Nr.	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen der Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	5	0,06	5h 33′	6h 32′	59
2	5	0,06	5h 33′	6h 32′	59
3	5	0,08	5h 33′	6h 23′	50
4	5	0,08	5h 33′	6h 23′	50
5	5	0,1	5h 08′	5h 48′	40
6	5	0,1	5h 08′	5h 48′	40
7	5	0,2	5h 55′	6h 17′	22
8	5	0,2	5h 55′	6h 17′	22
9	5	0,25	6h 00′	6h 12′	12
10	5	0,25	6h 00′	6h 12′	12

Aus den beiden Vorversuchen sieht man, wie sich die Gerinnungszeit verkürzt bei steigendem Labzusatz. Zudem geben sie uns wichtige Anhaltspunkte für die folgenden Versuche.

I. Versuch: In den Vorversuchen wurde das Labferment in steigender Menge dem stets konstanten Milchquantum (5 ccm) zugesetzt; dies bewirkte, daß die Gerinnungszeiten sich verkürzten. Die Hauptversuche nun legen den Einfluß der Temperatur auf das Labferment klar, bemessen an den Gerinnungszeiten. Dio 3 Komponenten: Milchquantum, Menge des Labfermentes und die Gerinnungstemperatur bleiben konstant. Das Labferment wird aber vor der Anwendung während 30 Minuten verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Der Einfluß der Temperatursteigerung kommt in den Gerinnungszeiten zum Ausdruck.

Lablösung: 1 ccm Labextrakt + 100 ccm Leitungswasser. Diese Lablösung wird während 30 Minuten einer Temperatur von 35° C ausgesetzt. Hierauf wird das Ferment der Milch beigegeben; die Gerinnung erfolgt in einem Wasserbade von 35° C. G. Z. = Gerinnungszeit.

Nr.	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen der Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	5	0,2	2h 50′	3h 26′	36
2	5	0,2	2h 50′	3h 26′	36
3	5	0,2	2h 50′	3h 26′	36
4	5	0,2	2h 50′	3h 26′	36
5	5	0,2	2h 50′	3h 10′	20

Zur Kontrolle wurde in Nr. 5 Labferment verwendet, das keiner Temperatursteigerung ausgesetzt war. Vergleichen wir die Gerinnungszeiten der Nr. 1—4 mit der der Nr. 5, so sehen wir, daß die Temperatursteigerung auf das Labferment die Gerinnungsgeschwindigkeit bedeutend herabgesetzt hat.

II. Versuch: Lablösung: 1 ccm Labextrakt + 100 ccm Leitungswasser. Beeinflussung: Die Lablösung wird während 30 Minuten einer Temperatur von 30° C ausgesetzt; hierauf wird die Gerinnung bei 35° C vorgenommen.

Nr. 5 erhält zur Vergleichung unbeeinflußtes Labferment. Die Gerinnungsgeschwindigkeit wurde durch 30° C viel weniger gehemmt als durch 35° C.

Digitized by Google

Nr.	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen der Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	5	0,2	3h 50′	4h 15′	25
2	5	0,2	3h 50′	4h 15′	25
3	5	0,2	3h 50′	4h 15′	25
4	5	0,2	3h 50′	4h 15′	25
5	5	0,2	3h 50′	4h 10′	20

III. Versuch: Lablösung: 0,5 ccm Labextrakt + 50 ccm Wasser. Beeinflussung: Die Lablösung wird während 30 Minuten einer Temperatur von 25° C ausgesetzt. Die Milchgerinnung erfolgt wieder bei 35° C.

Nr.	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen der Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	5	0,2	5h 12′	5h 34′	22
2	5	0,2	5h 12′	5h 34′	22
3	5	0,2	5h 12′	5h 34′	22
4	5	0,2	5h 12′	5h 34′	22
5	5	0,2	5h 12′	5h 32′	20

In Nr. 5 wurde der Milch unbeeinflußte Lablösung zugegeben; die Gerinnung ist, wie in allen 3 Versuchen, nach 20 Minuten erfolgt. Auch in dieser Versuchsreihe wird der Gerinnungsvorgang noch gehemmt; das Labferment wird aber weniger geschädigt als in den vorhergehenden Versuchen.

IV. Versuch: Lablösung: 2 ccm Labextrakt + 200 ccm Wasser. Beeinflussung: Die Lablösung wird während 30 Minuten je Temperaturen von 5°—35° C ausgesetzt. Das durch so viel verschiedene Temperaturen beeinflußte Lab wird zur Milchgerinnung benutzt. Die Gerinnung wird in allen Gläschen bei 35° C vorgenommen.

Nr.	Temperatureinwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	35°	5	0,3	3h 11′	4h 05′	54
2	35°	5	0,3	3h 11′	4h 05′	54
3	30°	5	0,3	2h 34′	3h 06′	32
4	30°	5	0,3	2h 34′	3h 06′	32
5	25°	5	0,3	2h 18′	2h 43′	25
6	25°	5	0,3	2h 18′	2h 43′	25
7	20°	5	0.3	3h 20′	3h 40′	20
8	20°	5	0,3	3h 20′	3h 40′	20
9	15°	5	0,3	3h 51′	4h 13′	22
10	15°	5	0,3	3h 51′	4h 13′	22
11	10°	5	0,3	3h 41′	4h 02′	21
12	10°	5	0,3	3h 41′	4h 02′	21
13	5°	5	0,3	4h 00′	4h 20′	20
14	5°	5	0,3	4h 00′	4h 20½	20

Die Einwirkung der Temperatur von 35° C während 30 Minuten auf das Labferment hat zur Folge, daß das Gerinnungsvermögen sehr stark geschädigt wird. Die Hemmung ist auch noch vorhanden bei 25° C.

Digitized by Google

V. Versuch: Lablösung: 2 ccm Labextrakt + 200 ccm Wasser. Beeinflussung: Die Lablösung wird während einer Stunde verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Erst hierauf wird das Labferment den Milchportionen zugefügt; die Gerinnungstemperatur wird konstant bei 35° C gehalten.

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	35°	5	0,3	4h 05′	6h 03′	118
2	35°	5	0,3	4h 05′	6h 03′	118
3	33°	5	0,3	4h 16′	5h 49′	93
4	33°	5	0,3	4h 16′	5h 49′	93
5	30°	5	0,3	2h 56′	3h 26′	30
6	30°	5	0,3	2h 56′	3h 26′	30
7	25°	5	0,3	3h 03′	3h 26′	23
8	25°	5	0,3	3h 03′	3h 26′	23
9	20°	5	0,3	3h 05′	3h 25′	20
10	20°	5	0,3	3h 05′	3h 25′	20
11	15°	5	0,3	4h 30′	4h 49′	19
12	15°	5	0,3	4h 30′	4h 49½′	19½
13	10°	5	0,3	3h 20′	3h 39′	19
14	10°	5	0,3	3h 20′	3h 39′	19
15	5°	5	0,3	5h 00′	5h 19½′	19½
16	5°	5	0,3	5h 00′	5h 19½′	19½

Die Gerinnungszeiten werden in einer Kurve dargestellt und näher besprochen.

VI. Versuch: Lablösung: 3 ccm Labextrakt + 300 ccm Wasser. Beeinflussung: Die Lablösung wird wie im V. Versuche verschiedenen Temperaturen ausgesetzt; die nachfolgende Milchgerinnung wird aber in dieser Versuchsreihe bei 30° C ausgeführt.

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	35°	5	0,3	3h 03′	5h 07′	124
2	35°	5	0,3	3h 03′	5h 07′	124
3	33°	5	0,3	4h 25′	6h 07′	102
4	33°	5	0,3	4h 25′	6h 07′	102
5	30°	5	0,3	4h 00′	4h 37′	37
6	30°	5	0,3	4h 00′	4h 37′	37
7	25°	5	0,3	3h 15′	3h 43′	28
8	25°	5	0,3	3h 15′	3h 43′	28
9	20°	5	0,3	4h 08′	4h 34′	26
10	20°	5	0,3	4h 08′	4h 34′	26
11	15°	5	0,3	3h 23′	3h 47′	24
12	15°	5	0,3	3h 23′	3h 43′	24
13	10°	5	0,3	3h 30′	3h 54′	24
14	10°	5	0,3	3h 30′	3h 54½′	24½
15	5°	5	0,3	4h 53′	5h 17′	24
16	5°	5	0,3	4h 53′	5h 17′	24

Die Gerinnungszeiten dieses Versuches werden in einer Kurve dargestellt und besprochen.

Digitized by Google

Die Gerinnungszeiten der V. Versuchsreihe geben zu folgenden Bemerkungen Anlaß:

Wird die verdünnte wässerige Lablösung allein je steigenden Temperaturen ausgesetzt und dann die Gerinnung der Milch-Labmischung bei stets gleichbleibender Temperatur vorgenommen, so kann man feststellen, daß schon bei der einwirkenden Temperatur von 25° C das Gerinnungsvermögen des Labes geschädigt wird. Die Schädigung der Labfermentes verstärkt sich bei 30° C. Einwirkende Temperaturen von 33° und 35° C hemmen den nachfolgenden Gerinnungsvorgang außerordentlich stark. Bei 35° C ist die Schädigung der gerinnungserregenden Wirkung des Labfermentes so stark, daß die Gerinnung erst nach 118 Minuten erfolgte; unbeeinflußtes Lab dagegen hat in 20 Minuten ein festes Koagulum gebildet. Lassen wir Temperaturen von 5°—20° C auf die Lablösung einwirken, so sehen wir, daß die Gerinnungszeiten konstant bleiben, somit wurde dabei die Fermentwirkung nicht beeinflußt.

Vergleichen wir nun die Gerinnungszeiten der V. mit denen der VI. Versuchsreihe, so sehen wir, daß der Gerinnungsvorgang in allen Nummern des VI. Versuches nur 5—9 Minuten verzögert wurde. Diese allgemeine Hemmung beruht darauf, daß die Gerinnung im VI. Versuche bei 30° C vorgenommen wurde. Betrachten wir aber die Gerinnungszeiten näher, so zeigt sich, daß die Temperatursteigerungen auf das isolierte Lab dieselben Hemmungen des Gerinnungsvorganges hervorgerufen haben, wie im vorhergehenden Versuche.

Bei der Milchgerinnung müssen wir 2 Prozesse auseinanderhalten, um die Wirkung der Temperatur zu verstehen. Erstens beschleunigt die Temperatursteigerung den Gerinnungsvorgang, das Optimum für die Milchgerinnung liegt zwischen 35 und 40° C. Zweitens vermindert die Temperatursteigerung das Gerinnungsvermögen des Labfermentes. Lassen wir die Temperaturen auf die wässerige Lablösung einwirken, so wird die gerinnungserregende Wirkung des Labfermentes schon bei relativ niederen Temperaturen geschädigt, vermutlich infolge einer hydrolytischen Spaltung.

Was nun die graphische Darstellung der Gerinnungsvorgänge der beiden Versuche anbelangt, so entspricht die Kurve V dem V. Versuche und die Kurve VI dem VI. Versuche. Die beiden Kurven verlaufen ziemlich genau parallel, das heißt die Temperatur-

Digitized by Google

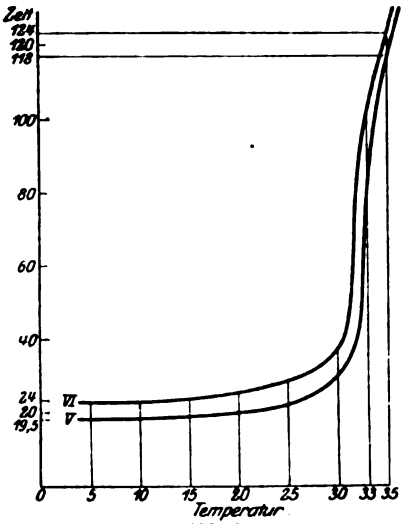


Abb. 1.

steigerungen hatten entsprechende Hemmungen der Gerinnungsvorgänge zur Folge. Da aber die Temperatursteigerung den Gerinnungsvorgang beschleunigt, so sind die Gerinnungszeiten im V. Versuche, wo die Gerinnung bei 35° C erfolgte, kürzer, als die im VI. Versuch, wo die Gerinnung bei 30° C vorgenommen wurde. Dies kommt in der graphischen Darstellung sehr schön zum Ausdruck, indem die Kurve des VI. Versuches über diejenige des V. zu stehen kommt.

VII. Versuch: In den zwei vorhergehenden Versuchen habe ich hervorgehoben, daß bei der Milchgerinnung zwei Prozesse nebeneinander verlaufen. Ich möchte nun in diesem Versuche zeigen, wie die Temperatur den Gerinnungsvorgang beschleunigt. Es wird also der Milch unbeeinflußtes

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzend Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	55°	5	0,3	3h 38′	nach 2 Std. flockige	
2	55°	5	0,3	3h 38′	Ausscheidung	
3	53°	5	0,3	5h 53′	6h 13′	20
4	53°	5	0,3	5h 53′	6h 13′	20
5	50°	5	0,3	3h 07′	3h 16′	9
6	50°	5	0,3	3h 07′	3h 16′	9
7	45°	5	0,3	3h 00′	3h 07′	7
8	45°	5	0,3	3h 00′	3h 07′	7
9	40°	5	0,3	5h 13′	5h 19′	6
10	40°	5	0,3	5h 13′	5h 19′	6
11	35°	5	0,3	5h 24′	5h 30′	6
12	35°	5	0,3	5h 24′	5h 30′	6
13	30°	5	0,3	4h 45′	4h 54′	9
14	30°	5	0,3	4h 45′	4h 54′	9
15	25°	5	0,3	4h 22′	4h 38′	16
16	25°	5	0,3	4h 22′	4h 38′	16
17	20°	5	0,3	4h 08′	4h 32′	24
18	20°	5	0,3	4h 08′	4h 32′	24
19	15°	5	0,3	3h 49′	4h 42′	53
20	15°	5	0,3	3h 49′	4h 42′	53
21	10°	5	0,3	3h 24′	nach 2 Std. flockige	
22	10°	5	0,3	3h 24′	Ausscheidung	
23	5°	5	0,3	3h 12′	nach 2 Stunden	
24	5°	5	0,3	3h 12′	Milch unverändert.	

Digitized by Google

Lab zugegeben, der Gerinnungsvorgang wird aber bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen.

Aus den Tabellen des VII. Versuches ergibt sich die bekannte Tatsache, daß das Optimum für die Milchgerinnung zwischen 35° und 40° C liegt. Bei 10° C und bei 55° C ist der Gerinnungsvorgang nach 2 Stunden gleich weit fortgeschritten. Die nebenstehende Kurve zeigt uns, wie die Gerinnungsgeschwindigkeit von 35° bis zu 10° und von 40° bis zu 55° C abnimmt. Die Gerinnungsgeschwindigkeit nimmt von 10° bis 35° C ziemlich gleichmäßig zu. Von 53° an neigt die Kurve fast senkrecht in die Höhe, die Gerinnung wird also zwischen 53° und 55° aufgehoben.

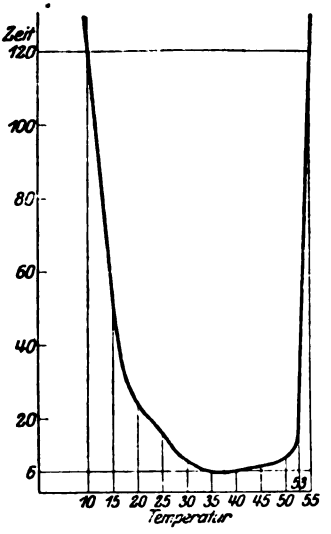


Abb. 2.

VIII. Versuch: In den Versuchen I—VI ist immer die verdünnte Lablösung (1 : 100) den Temperaturen ausgesetzt worden. In diesem Versuche lasse ich nun die Temperatursteigerungen auf das unverdünnte Labextrakt einwirken. Erst nach der Beeinflussung wird das Labextrakt mit destilliertem Wasser 1 : 100 verdünnt und zur Milchgerinnung verwendet.

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	35°	5	0,3	3h 27′	3h 48′	21
2	35°	5	0,3	3h 27′	3h 48′	21
3	33°	5	0,3	3h 27′	3h 47′	20
4	33°	5	3,0	3h 27′	3h 47′	20
5	30°	5	0,3	4h 33′	4h 51′	18
6	30°	5	0,3	4h 33′	4h 51′	18
7	25°	5	0,3	3h 40′	3h 56′	16
8	25°	5	0,3	3h 40′	3h 56′	16
9	20°	5	0,3	3h 46′	3h 58′	12
10	20°	5	0,3	3h 46′	3h 58′	12
11	15°	5	0,3	4h 58′	5h 10′	12
12	15°	5	0,3	4h 58′	5h 10′	12
13	10°	5	0,3	5h 40′	5h 51½′	11½
14	10°	5	0,3	5h 40′	5h 12′	12
15	5°	5	0,3	5h 24′	5h 36′	12
16	5°	5	0,3	5h 24′	5h 36′	12

Aus den Tabellen sieht man, daß sich bei 25° C eine Hemmung bemerkbar macht. Bei höheren Temperaturen verstärkt sich die Schädigung des Gerinnungsvermögens. Der Gerinnungsvorgang wird viel weniger verzögert, wenn wir die Temperaturen auf das unverdünnte Labextrakt einwirken lassen. Die Hemmung ist wohl aus dem Grunde geringer, weil die Bedingungen für die hydrolytische Spaltung des Labfermentes im un-

Digitized by Google

verdünnten Labextrakt ungünstiger sind, als in der stark verdünnten, wässerigen Lablösung.

IX. Versuch: Im VII. Versuche wurde festgestellt, daß das Optimum für die Milchgerinnung zwischen 35 und 40° C liegt. Lassen wir aber die Temperaturen auf das isolierte Lab einwirken, so finden wir, daß das Gerinnungsvermögen schon bei niederen Temperaturen (25° C) geschädigt wird. Daraus geht die Tatsache hervor, daß die Milch Stoffe enthält, die das Labferment gegen Temperatureinwirkungen schützen. Um diese Schutzwirkung zu demonstrieren, habe ich der wässerigen Lablösung etwas gekochte, abgekühlte Milch zugegeben; diese Labmischung wird während 1 Stunde verschiedenen Temperaturen ausgesetzt und nachher die Milchgerinnung bei 35° C vorgenommen.

Lablösung: 90 ccm destill. Wasser, 10 ccm gekochte abgekühlte Milch, 1 ccm Labextrakt.

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	35°	5	0,3	3h 33′	3h 54′	21
2	35°	5	0,3	3h 33′	3h 54′	21
3	30°	5	0,3	4h 36′	4h 54′	18
4	30°	5	0,3	4h 36′	4h 54′	18
5	25°	5	0,3	3h 33′	3h 48½′	15½
6	25°	5	0,3	3h 33′	3h 48½′	15½
7	20°	5	0,3	3h 33′	3h 48′	15
8	20°	5	0,3	3h 33′	3h 48′	15
9	15°	5	0,3	4h 36′	4h 50′	14
10	15°	5	0,3	4h 36′	4h 50′	14
11	10°	5	0,3	3h 53½′	4h 06½′	13
12	10°	5	0,3	3h 53½′	4h 06½′	13
13	5°	5	0,3	3h 53½′	4h 06½′	13
14	5	5	0,3	3h 53½′	4h 06½′	13

Vergleichen wir die Gerinnungszeiten dieses Versuches mit denen des V. Versuches, so sehen wir deutlich, daß die Hemmung der Gerinnungsgeschwindigkeit viel geringer ist, wenn der Lablösung etwas gekochte Milch beigegeben wird, bevor sie durch Temperaturen beeinflußt wird.

X. Versuch: In dieser Versuchsreihe kommt ein Lab-Glyzerinextrakt zur Anwendung, das wir wie folgt hergestellt haben:

5 Labtabletten à 1 g werden gut pulverisiert und dann mit 50 ccm Glyzerin angerieben. Dies läßt man nun 24 Stunden im Eisschrank stehen; hierauf wird es durch einen Gazefilter filtriert.

Dieses Lab-Glyzerinextrakt wird 1 : 100 mit Glyzerin verdünnt und nachher je steigenden Temperaturen ausgesetzt. Die Beeinflussung durch die Temperaturen dauert 1 Stunde; die nachfolgende Milchgerinnung wird bei 35° C vorgenommen. Die Anwendung des Glyzerins geschah aus dem Grunde, die hydrolytische Spaltung des Labfermentes in diesen Versuchen ganz auszuschalten. Wird nun das Gerinnungsvermögen im Lab-Glyzerinextrakt auch gehemmt, so dürfen wir annehmen, daß die Hemmung allein auf die Temperatursteigerung zurückzuführen ist.

Digitized by Google

Nr.	Temperatur-einwirkung	Milch ccm	Lablösung ccm	Einsetzen d. Gerinnungstemp.	Gerinnung	Gerinnungszeit
1	unbeeinflußt	5	0,4	$3^h 46^1/_2'$	$3^h 59'$	$12^1/_2$
2		5	0,4	$3^h 46^1/_2'$	$3^h 59'$	$12^1/_2$
3	50°	5	0,4	$3^h 46^1/_2'$	$4^h 05^1/_2'$	19
4		5	0,4	$3^h 46^1/_2'$	$4^h 05^1/_2'$	19
5	45°	5	0,4	$3^h 52'$	$4^h 07'$	15
6		5	0,4	$3^h 52'$	$4^h 07'$	15
7	40°	5	0,4	$4^h 50^1/_2'$	$5^h 03'$	$12^1/_2$
8		5	0,4	$4^h 50^1/_2'$	$5^h 03'$	$12^1/_2$
9	35°	5	0,4	$4^h 50^1/_2'$	$5^h 03'$	$12^1/_2$
10		5	0,4	$4^h 50^1/_2'$	$5^h 03'$	$12^1/_2$
11	30°	5	0,4	$4^h 02^1/_2'$	$4^h 15'$	$12^1/_2$
12		5	0,4	$4^h 02^1/_2'$	$4^h 15'$	$12^1/_2$
13	25°	5	0,4	$4^h 07'$	$4^h 19^1/_2'$	$12^1/_2$
14		5	0,4	$4^h 07'$	$4^h 19^1/_2'$	$12^1/_2$
15	20°	5	0,4	$4^h 33'$	$4^h 45^1/_2'$	$12^1/_2$
16		5	0,4	$4^h 33'$	$4^h 45^1/_2'$	$12^1/_2$
17	15°	5	0,4	$4^h 40'$	$4^h 52'$	12
18		5	0,4	$4^h 40'$	$4^h 52^1/_2'$	$12^1/_2$

Temperaturen von 15°—40° C haben keinen Einfluß auf das Labferment, wenn es in Glycerin gehalten wird; das heißt der Gerinnungsvorgang läuft gleich ab wie derjenige, hervorgerufen durch unbeeinflußtes Labferment. Erst wenn wir Temperaturen von 45° C und 50° C auf das Lab in Glycerin einwirken lassen, so wird die gerinnungserregende Wirkung des Labfermentes geschädigt. Diese Tatsache scheint mir praktische Bedeutung zu haben, denn das Lab-Glycerinextrakt wäre doch gewiß viel haltbarer als die anderen Labpräparate. Zudem kann ich bemerken, daß das Lab-Glycerinextrakt in allen Gläschen ein schön zusammenhängendes, gallertartiges Koagulum erzeugt hat.

Einfluß der Temperatur auf das Pepsin allein bei der Caseinverdauung.

1. Versuchsmethode.

Wir haben zu unsern Versuchen die Methode von Gross zur Bestimmung der Wirksamkeit von Pepsin herbeigezogen.

Ausführung: 1 g Casein (nach Hammarsten) mit 18 ccm einer 25 proz. HCl-Lösung wird in 1 l Wasser auf dem Wasserbad gelöst. Die Lösung wird 24 Stunden in den Eisschrank gestellt und nachher filtriert, um das ungelöste Casein zu entfernen. Je 5 ccm dieser Caseinlösung kommen in eine Reihe Reagensgläser, die hierauf mit steigenden Mengen einer 100fach verdünnten Lösung von Pepsinum liquidum beschickt werden. Während der Beimischung des Pepsins zum Casein befinden sich die Röhrchen in Eiswasser, damit vorläufig die Fermentwirkung ausgeschaltet wird. Sind alle Gläschen so vorbereitet, so stellt man sie in ein Wasserbad mit der

Digitized by Google

Temperatur 35° C. Nach einer Viertelstunde bringt man sie wieder in Eiswasser, um die Caseinspaltung zu unterbrechen. Ist der Inhalt in den Gläschen abgekühlt, so gibt man in jede Portion einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von essigsaurem Natron. Das unverdaute Casein fällt dabei aus, im Gegensatz zu den Caseosen.

Um nun den Einfluß der Temperatur auf das Pepsin näher zu studieren, muß man einige Portionen Pepsinlösung verschiedenen Temperaturen aussetzen. Die Einwirkung der Temperaturen haben wir zuerst auf 30 Minuten, dann auf 50 Minuten ausgedehnt. Das auf diese Art beeinflußte Pepsin wird hierauf zur Caseinverdauung verwendet. Hat nun die Temperatursteigerung einen Einfluß ausgeübt auf das Spaltungsvermögen des Pepsins, so ist die Caseinverdauung in den entsprechenden Gläschen verzögert.

2. Eigene Versuche.

I. Vorversuche: Das Pepsinum liquidum wird mit destilliertem Wasser 100fach verdünnt; es wird aber keinen erhöhten Temperaturen ausgesetzt. In den Vorversuchen soll vorerst die Wirkung des unbeeinflußten Pepsins auf die Caseinlösung demonstriert werden. Zudem werden Serien von je 5 Gläschen ausprobiert, die alle Stadien der Caseinverdauung aufweisen.

Nr.	Caseinlösung ccm	Pepsinlösung ccm	Nachweis von Casein mit essigsaurem Natron
1	10	0,02	+++
2	10	0,04	+++
3	10	0,06	++
4	10	0,08	++
5	10	0,1	+
1	10	0,1	+
2	10	0,2	−
3	10	0,3	−
4	10	0,4	−
5	10	0,5	−
1	5	—	++++
2	5	0,02	+++
3	5	0,04	++
4	5	0,06	+
5	5	0,08	−
1	5	0,04	++
2	5	0,06	+
3	5	0,08	−
4	5	0,1	−
5	5	0,12	−

+++ = starke Trübung, enthält also noch viel Casein.
++ = mittelstarke Trübung, enthält also noch Casein.
+ = schwache Trübung, enthält nur wenig Casein.
— = keine Trübung, alles Casein ist zu Caseosen abgebaut.

Digitized by Google

Aus diesen Vorversuchen geht hervor, daß die Fermentwirkung des Pepsins sehr stark ist. Die Menge des Caseins, die Spaltungstemperatur (35° C) und die Zeitdauer der Einwirkung des Pepsins auf das Casein wurden konstant gehalten. Variabel war in den verschiedenen Serien die Menge des Pepsins. Bei steigender Pepsinmenge verkürzt sich der Vorgang der Caseinspaltung.

I. Versuch: Das Pepsinum liquidum wird mit destilliertem Wasser 1 : 100 verdünnt. Hierauf verteilt man diese Pepsinlösung auf verschiedene Reagensgläschen. Jede dieser Portionen wird nun während 30 Minuten einer bestimmten Temperatur ausgesetzt. Sind die Pepsinlösungen so durch die Temperaturen beeinflußt, dann verwendet man sie zur Caseinverdauung. Hat die einwirkende Temperatur das Pepsin geschädigt, so wird in der betreffenden Serie die Caseinspaltung verzögert sein.

Nr.	Beeinflussung der Pepsinlösung ½ Stunde	Caseinlösung ccm	Pepsinlösung ccm	Nachweis von Casein mit Natriumacetat
1	unbeeinflußt	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	35° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	30° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	25° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	20° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	15° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	10° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−

Digitized by Google

Aus den Tabellen des I. Versuches geht hervor, daß in allen Serien à 5 Gläschen die Caseinverdauung gleich weit fortgeschritten ist nach 15 Minuten bei einer Temperatur von 35° C. Somit können wir sagen, daß Temperatureinwirkungen zwischen 10° und 35° C, während 30 Minuten, die Wirkung des Pepsins in verdünnter Lösung absolut nicht beeinflussen.

II. Versuch: Im II. Versuche lasse ich Temperaturen von 10° bis 40° C während einer Stunde auf die Pepsinlösung einwirken. Die übrigen Versuchsanordnungen sind gleich wie im I. Versuche.

Nr.	Beeinflussung der Pepsinlösung 1 Stunde	Caseinlösung ccm	Pepsinlösung ccm	Nachweis von Casein mit Natriumacetat
1	40° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	35° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	30° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	25° C	5	0,04	+
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	20° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	15° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	10° C	5	0,04	++
2		5	0,06	+
3		5	0,08	−
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−

Die Caseinspaltung ist im II. Versuche überall gleich, somit haben Temperatureinwirkungen bis zu 40° C während 1 Stunde keinen Einfluß auf das Spaltungsvermögen des Pepsins.

Digitized by Google

III. Versuch: Das unverdünnte Pepsinum liquidum wird während 1 Stunde Temperaturen von 10°—50° C ausgesetzt. Hierauf wird die Caseinverdauung angesetzt, wie in der Versuchsanordnung eingehend beschrieben worden ist.

Nr.	Beeinflussung der Pepsinum liquidum	Caseinlösung ccm	Pepsinlösung ccm	Nachweis von Casein mit Natriumacetat
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	+++
3		5	0,08	+++
4		5	0,1	+++
5		5	0,12	++
6	50° C	5	0,14	++
7		5	0,16	+
8		5	0,18	+
9		5	0,2	−
10		5	0,22	−
11		5	0,24	−
12		5	0,26	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	+++
3		5	0,08	+++
4		5	0,1	++
5		5	0,12	+
6	45° C	5	0,14	−
7		5	0,16	−
8		5	0,18	−
9		5	0,2	−
10		5	0,22	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3	40° C	5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3	35° C	5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3	30° C	5	0,08	++
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3	25° C	5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1		5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3	20° C	5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−

Digitized by Google

Nr.	Beeinflussung der Pepsinum liquidum	Caseinlösung ccm	Pepsinlösung ccm	Nachweis von Casein mit Natriumacetat
1	15° C	5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3		5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	10° C	5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3		5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−
1	Zur Kontrolle wurde hier unbeeinflußtes Pepsin verwendet	5	0,04	+++
2		5	0,06	++
3		5	0,08	+
4		5	0,1	−
5		5	0,12	−

+++ = starke Fällung. ++ = mittelstarke Fällung. − = schwache Fällung.

Aus den Tabellen der III. Versuchsreihe geht folgendes hervor:

In den Serien, wo Pepsin benutzt wurde, das vor der Verwendung Temperatursteigerungen von 10—40° C ausgesetzt war, ist die Caseinverdauung gleich weit fortgeschritten Zwischen diesen Temperaturen wird also die Fermentwirkung des Pepsins nicht beeinflußt, denn die Grenze, wo alles Casein zu Caseosen abgebaut ist, wird stets durch dieselbe Pepsinmenge erreicht. — Wird das Pepsin während einer Stunde bei 45° C gehalten, so muß man mehr Pepsin verwenden, um die gleiche Menge Casein in der gleichen Zeit und bei derselben Temperatur abzubauen; die Wirkung des Pepsins wird also bei 45° C geschädigt. Die Hemmung der Caseinverdauung kommt noch deutlicher zum Ausdruck, wenn das Pepsin durch 50° C beeinflußt wurde.

Einfluß der Temperatur auf die Diastase bei der Stärkespaltung.

1. Eigene Versuche.

I. Vorversuche: In den Vorversuchen wird die Diastase unbeeinflußt verwendet, d. h. sie wird keinen höheren Temperaturen ausgesetzt. Diese Versuche sollen uns Aufschluß geben über das Spaltungsvermögen der Diastase im Merckschen Präparate. Zudem wird in den Vorversuchen eine Serie à 5 Gläschen ausprobiert, bei der, nach der Beobachtungszeit von 30 Minuten, in 3 Gläschen noch Stärke nachweisbar ist und in 2 keine mehr.

Digitized by Google

Stärkelösung: 1 g Amylum solubile (Kahlbaum) wird in 100 ccm heißem Wasser gelöst und dann abgekühlt.

Diastaselösung: 0,1 g Diastase (Merck) wird in 50 ccm destilliertem Wasser aufgelöst.

Nr.	Stärkelösung ccm	Diastaselösung ccm	Nachweis von Stärke mit $^{n}/_{10}$-Jodlösung	
1	5	0,1	blau	III. Serie
2	5	0,2	blau	
3	5	0,3	blau	
4	5	0,4	blau	
5	5	0,5	blau	
1	5	0,6	blau	II. Serie
2	5	0,8	violett	
3	5	1,0	schwach violett	
4	5	1,2	farblos	
5	5	1,4	farblos	
1	5	1,5		III. Serie
2	5	1,6		
3	5	1,7	farblos	
4	5	1,8		
5	5	1,9		

Alle Gläschen der I. Serie zeigen nach Jodzusatz eine dunkelblaue Farbe, die typische Stärkereaktion, somit enthalten alle Portionen dieser Serie vorwiegend unveränderte Stärke. In der II. Serie sieht man sehr schön das Verschwinden der Blaufärbung bei steigender Diastasenmenge: Nr. 1 enthält vorwiegend unveränderte Stärke; Nr. 2 zeigt Stärke und deren Abbauprodukte; Nr. 3 enthält noch Spuren unveränderter Stärke und wird als unterste Grenze der Wirksamkeit bezeichnet, denn die nachfolgenden Nr. 4 und 5 zeigen keine Stärkereaktion mehr.

Für die nachfolgenden Versuche, wo ich die Diastase vor der Verwendung durch Temperatursteigerung beeinflusse, wähle ich die II. Serie.

I. Versuch: Stärkelösung: 2 g lösliche Stärke + 200 g heißes destilliertes Wasser.

Diastaselösung: 0,2 g Diastase werden in 100 g destilliertem Wasser gut aufgelöst.

Bevor nun die Diastaselösung den Gläschen mit Stärkelösung beigegeben wird, lasse ich während 60 Minuten Temperaturen von 25°—40° C auf die Diastase einwirken. Haben nun diese Temperaturen einen Einfluß auf die Wirksamkeit der Diastase, so müssen sich in den betreffenden Serien Unterschiede zeigen im Stärkeabbau. Zur Vergleichung mache ich zuerst immer eine Serie mit unbeeinflußter Diastase.

Aus den Tabellen des I. Versuches geht hervor, daß in allen entsprechenden Nummern der verschiedenen Serien der Stärkeabbau gleich weit fortgeschritten ist. Somit ist die Wirksamkeit der Diastase durch Temperaturen von 25°—40° C nicht beeinflußt worden.

Digitized by Google

Nr.	Temperatur-einwirkung	Stärkelösung ccm	Diastase-lösung ccm	Nachweis von Stärke mit $^n/_{10}$-Jodlösung
1	unbeeinflußt	5	0,6	blau
2		5	0,8	violett
3		5	1,0	schwach violett
4		5	1,2	farblos
5		5	1,4	farblos.
1	40° C	5	0,6	blau
2		5	0,8	violett
3		5	1,0	schwach violett
4		5	1,2	farblos
5		5	1,4	farblos.
1	35° C	5	0,6	blau
2		5	0,8	violett
3		5	1,0	schwach violett
4		5	1,2	farblos
5		5	1,4	farblos.
1	30° C	5	0,6	blau
2		5	0,8	violett
3		5	1,0	schwach violett
4		5	1,2	farblos
5		5	1,4	farblos.
1	25° C	5	0,6	blau
2		5	0,8	violett
3		5	1,0	schwach violett
4		5	1,2	farblos
5		5	1,4	farblos.

II. Versuch: Stärkelösung: 5 g lösliche Stärke auf 500 ccm dest. Wasser.

Diastaselösung: 0,4 g Diastase (Merck) werden in 100 ccm dest. Wasser aufgelöst.

Die Diastaselösung wird vor der Verwendung zum Stärkeabbau durch Temperaturen von 5°—50° C beeinflußt. Die Temperatureinwirkung dauert 60 Minuten an. Die übrigen Versuchsbedingungen sind gleich gehalten, wie sie in der allgemeinen Versuchsmethode beschrieben sind.

Nr.	Temperatur-einwirkung	Stärkelösung ccm	Diastase-lösung ccm	Nachweis von Stärke mit $^n/_{10}$-Jodlösung
1	unbeeinflußt	5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3		5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1	5° C	5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3		5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos

Digitized by Google

Nr.	Temperatur-einwirkung	Stärkelösung ccm	Diastase-lösung ccm	Nachweis von Stärke mit $^{n}/_{10}$-Jodlösung
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	10° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	15° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	20° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	25° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	30° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	35° C	5	0,5	schwach-violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,3	blau
2		5	0,4	violett
3	40° C	5	0,5	schwach violett
4		5	0,6	farblos
5		5	0,7	farblos.
1		5	0,6	blau
2		5	0,7	blau
3		5	0,8	blau
4		5	0,9	blau
5		5	1,0	blau
6		5	1,1	blau
7		5	1,2	blau
8	45° C.	5	1,3	blau
9		5	1,4	blauviolett
10		5	1,5	violett
11		5	1,6	violett
12		5	1,7	schwach violett
13		5	1,8	farblos
14		5	1,9	farblos
15		5	2,0	farblos.

Digitized by Google

Nr.	Temperatur-einwirkung	Stärkelösung ccm	Diastase-lösung ccm	Nachweis von Stärke mit $^n/_{10}$-Jodlösung
1	50° C	5	0,7	blau
2		5	0,8	blau
3		5	0,9	blau
4		5	1.0	blau
5		5	1,1	blau
6		5	1,2	blau
7		5	1,3	blau
8		5	1,4	blau
9		5	1,5	blau
10		5	1,6	blau
11		5	1,7	blau
12		5	1,8	blau
13		5	1,9	blau
14		5	2,0	blau
15		5	2,1	blau
16		5	2,2	blau
17		5	2,3	blau
18		5	2,4	blau
19		5	2,5	blauviolett
20		5	2,6	violett
21		5	2,7	schwach violett
22		5	2,8	farblos
23		5	2,9	farblos
24		5	3,0	farblos
25		5	3,1	farblos.

Die Ergebnisse des II. Versuches lassen sich folgendermaßen zusammenstellen:

Wird Diastase allein je steigenden Temperaturen von 5—40° C ausgesetzt und dann der Abbau der Stärke-Diastasemischung bei stets gleichbleibender Temperatur vorgenommen, so kann man feststellen, daß diese Temperaturen keinen Einfluß haben auf die Fermentwirkung der Diastase.

Lasse ich aber eine Temperatur von 45° C auf die Diastaselösung einwirken, so muß ich die 3fache Menge Diastase zusetzen, um in der gleichen Zeitdauer, bei gleicher Temperatur, dieselbe Menge Stärke zu spalten. Die Wirkung der Diastase wird somit bei 45° C gehemmt.

Das Vermögen der Diastase, die Stärke zu Dextrin abzubauen, wird noch mehr geschädigt, wenn wir 50° C während einer Stunde auf das Ferment allein einwirken lassen.

Digitized by Google

Schlußresultate.

Die Ergebnisse meiner Versuche lassen sich wie folgt kurz zusammenfassen:

1. Das Labferment läßt sich in verdünnter Lösung durch Temperatursteigerung sehr stark beeinflussen.

2. Lab und Thrombin verhalten sich gegenüber Temperatursteigerungen gleich.

3. Das Lab, in Glycerin gehalten, behält die Wirkungsstärke viel länger. Man kann Temperaturen bis und mit 40° C auf Lab-Glycerinextrakt einwirken lassen, ohne daß die gerinnungserregende Wirkung des Labfermentes geschädigt wird.

4. Das konz. Labextrakt, wie es von Baumgartner in Zürich in den Handel kommt, zeigt sich gegen Temperatursteigerungen resistenter, als die wässerige Verdünnung davon.

5. Die Milch enthält Schutzstoffe gegen die schädigende Wirkung der Temperatursteigerung auf das Labferment.

6. Steigt die Menge der Milch bei gleichbleibender Labmenge, so wird dadurch der Ablauf der Gerinnung verzögert.

7. Bei der Milchgerinnung laufen zwei Prozesse nebeneinander her; erstens beschleunigt die Temperatursteigerung den Gerinnungsvorgang. Zweitens schädigt die Temperatursteigerung auf das isolierte Labferment dessen Gerinnungsvermögen. Befindet sich aber das Lab in der Milch, so macht sich diese Schädigung infolge der Schutzwirkung der Milch erst von 45° C an geltend.

8. Wird das Pepsin in wässeriger Verdünnung durch Temperaturen beeinflußt, so zeigt sich, daß die Caseinverdauung, bei einwirkenden Temperaturen bis 40° C auf das Pepsin allein, konstant bleibt.. Eine Hemmung tritt erst ein, wenn wir 45° C auf das isolierte Pepsin einwirken lassen.

9. Das käufliche Pepsinum liquidum verhält sich gegenüber Temperatureinwirkungen gleich wie die 100fache Verdünnung davon.

10. Die spaltende Wirkung der Diastase auf Stärke bleibt bei einwirkenden Temperaturen von 5—40° C unverändert. Erst Temperaturen von 45° C an schädigen das Spaltungsvermögen der Diastase.

11. Lab in Glycerin, Pepsin und Diastase zeigen dasselbe Verhalten gegenüber isoliert auf sie einwirkende Temperaturen.

Digitized by Google

12. Das konzentrierte Labextrakt und die wässerige Verdünnung davon verhalten sich gegenüber Temperatureinwirkungen nicht gleich, wie Lab in Glycerin, Pepsin und Diastase.

13. Lab und Pepsin werden in wässeriger Verdünnung durch Temperatursteigerungen nicht gleich beeinflußt; dies spricht zugunsten der Auffassung, daß Lab und Pepsin zwei verschiedene Fermente sind.

Digitized by Google

Über ein tryptophanhaltiges Tripeptid aus Casein.

Von

Sigmund Fränkel und Ernst Nassau.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 26. Juli 1920.)

Wenn man Eiweißkörper mit konzentrierter Salzsäure oder starker Schwefelsäure hydrolysiert, bekommt man dunkelgefärbte Flüssigkeiten, die beim Neutralisieren einen Niederschlag geben, den man als Huminsubstanz anspricht. Diese starke Färbung entsteht nicht, wie schon Hlasiwetz und Habermann beobachtet haben, wenn man Zinnchlorür als Reduktionsmittel während der Hydrolyse zusetzt, aber nach dem Entfernen des Zinns mittels Schwefelwasserstoff aus der Lösung färbt sich die Flüssigkeit an der Luft so stark wie bei ber Hydrolyse mit starken Säuren ohne Reduktionsmittel an. Da man nach der Hydrolyse mit Säuren aus dem Hydrolyseprodukt Tryptophan nicht mehr isolieren kann und auch die Tryptophanreaktionen der Flüssigkeit verschwunden sind, so ist es klar, daß das Tryptophan bei der Einwirkung von konzentrierten Säuren zerstört wird und wahrscheinlich mit dem Kohlenhydratkomplex der Eiweißkörper unter Bildung von starkgefärbten Produkten reagiert, während die anderen Aminosäuren bei einer derartigen Säurehydrolyse Veränderungen dieser Art nicht erleiden. Daß Tryptophan tatsächlich quantitativ bei Gegenwart von Aldehyden in Huminsubstanzen umgewandelt wird, haben Gortner und Holm[1]) neuerdings einwandfrei erwiesen. Im Gegensatz zur Säurehydrolyse zeigt die Hydrolyse von Eiweißkörpern mit Enzymen, welche bis zur Spaltung der kleineren Peptidketten und Abspaltung von freien Aminosäuren getrieben werden kann, kein Auftreten gefärbter Produkte und

[1]) Gortner und Holm, Journ. of the Amer. chem. Soc. **39**, 2477. 1917 und Holm und Gortner, ebda. **42**, 362. 1920.

Digitized by Google

es kann tatsächlich fast quantitativ aus diesen Eiweißkörpern durch Trypsinverdauung Tryptophan nach der üblichen Methode von Hopkins und Cole[1]) und ihren Modifikationen[2])[3])[4]) gewonnen werden. Ganz ähnlich wie die Fermenthydrolyse verhält sich die Einwirkung von Alkalien und alkalischen Erden auf Eiweißkörper[5]); die Eiweißkörper werden hydrolysiert, ohne daß sich gefärbte Substanzen während der Reaktion bilden, aber die Hydrolyse mit Alkalien und Erdalkalien geht nicht so weit wie mit Trypsin und Erepsin, sondern es bleiben noch kürzere oder längere Peptidketten erhalten, es spaltet sich ein Teil des Stickstoffes in Form von Ammoniak ab und die Biuretreaktion ist mehr oder minder erhalten geblieben, je nachdem wie lange, unter welchem Drucke und mit welcher Konzentration von Hydroxylionen gearbeitet wird. Diese vielfach in verschiedenen Instituten gemachte Beobachtung stand nur mit einer Behauptung im Widerspruche, die Annie Homer[6]) anläßlich der Ausarbeitung einer quantitativen Tryptophanbestimmung in Eiweißkörpern machte. Sie hydrolysiert Casein mit Barytlauge, indem sie bis zu 124 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, entfernt das Barium mit Schwefelsäure, filtriert und fällt in der Lösung, die sie auf 5 proz. Schwefelsäurekonzentration bringt, mit Quecksilbersulfat. Dann wäscht sie den Niederschlag mit 5 proz. Schwefelsäure, um Tyrosin zu entfernen, bis er keine Millonsche Reaktion zeigt, suspendiert in 2 proz. Schwefelsäure und zerlegt ihn mit Schwefelwasserstoff. Das Filtrat vom Quecksilbersulfid, das frei von Schwefelwasserstoff war, aber noch sauer reagierte, behandelt sie nun mit einer Phosphorwolframsäurelösung unter Vermeidung eines Überschusses. Nachdem sich der eventuell vorhandene Niederschlag von Polypeptiden abgesetzt hat, filtriert sie ab, entfernt den Überschuß an Phosphorwolframsäure mit Baryt und den Überschuß an Barium mit Schwefelsäure und benützt nun gleich die so erhaltene Lösung zur Tryptophanbestimmung. Das Tryptophan weist sie nur mit den üblichen Farbenreaktionen nach und läßt Analysenresultate vollkom-

[1]) Hopkins und Cole, Journ. of Physiol. **27**, 418—428.

[2]) C. Neuberg, Charité-Annalen **30**, 424—426.

[3]) Rud. Allers, diese Zeitschr. **6**, Heft 2/3, S. 273. 1907.

[4]) E. Abderhalden und Kempe, Zeitschr. f. physiol. Chemie **52**, 207. 1907.

[5]) Schützenberger, Ann. de Chim. [5], **16**. 2897.

[6]) Annie Homer, Journ. of Biolog. Chem. **22**, 369. 1915.

Digitized by Google

men vermissen. Es ist nun zweifelhaft, ob sie Tryptophan selbst in Lösung hatte, da die Farbenreaktionen kein genügender Beweis für freies Tryptophan sind, weil auch tryptophanhaltige Eiweißkörper und Peptidketten diese Reaktionen zeigen. Sie behauptet zwar, die Bromreaktion des freien Tryptophans erhalten zu haben, was aber bei unseren Versuchen nicht der Fall war und auch nicht erwartet werden konnte.

Bei alkalischer Hydrolyse ist natürlich schon vorauszusehen, daß man nicht die im Eiweiß präformierten optisch-aktiven Aminosäuren der Peptide bekommen wird, da unter der Einwirkung der Hydroxylionen die Spaltprodukte racemisiert werden und man die Racemkörper erhält, während bei der sauren Hydrolyse und Fermenthydrolyse eine solche Racemisierung, wenn überhaupt, nur zum geringen Teile eintritt. Die Racemisierung gerade des Tryptophans geht aber sehr leicht vor sich, wie im hiesigen Institute Rudolf Allers[1]) gezeigt hat. Er stellte das racemische Tryptophan dar, indem er Casein mit Pankreas verdaute, bis das Hydrolyseprodukt starke Bromreaktion zeigte. Nach Beendigung der Hydrolyse filtriert er ab, versetzt nun mit 5 proz. Schwefelsäure und fällt mit 10 proz. Lösung von Quecksilbersulfat, dann zerlegt er den Quecksilberniederschlag mit Schwefelwasserstoff, den er im Filtrate durch einen Kohlensäurestrom vertreibt. — Nun fällt er nach Neuberg fraktioniert mit Quecksilbersulfat. Die das Tryptophan enthaltenden Anteile behandelt er wie oben mit Schwefelwasserstoff und versetzt dann das Filtrat vom Quecksilbersulfid nach Entfernen des Schwefelwasserstoffes durch Kohlensäure mit 200 g Bleicarbonat und dann bei 60° mit Ammoniak bis zum Auftreten eines deutlich ammoniakalischen Geruches. Die Flüssigkeit filtriert er heiß, das in Lösung gegangene Blei schlägt er mit Schwefelwasserstoff nieder und nach Verjagung des letzteren versetzt er das Filtrat mit dem gleichen Volumen Alkohol; nun engt er das Filtrat im Vakuum bis auf ein Viertel ein, füllt mit Alkohol zum ursprünglichen Volumen auf und engt wieder ein. Das hierbei auskrystallisierende Tryptophan krystallisiert er aus 40—50 proz. Alkohol um und analysiert es. Es erweist sich als optisch inaktiv und es zeigte sich somit, daß schon unter der Einwirkung von wenig Ammoniak das l-Tryptophan in das d-l-Tryptophan übergeht.

[1]) Rud. Allers, diese Zeitschr. **6**, Heft 2/3, S. 272. 1907.

Digitized by Google

Da die Tryptophanreaktion mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure bei der alkalischen Hydrolyse nach unseren Beobachtungen nicht verschwand, die Reaktion des freien Tryptophans mit Brom hingegen gar nicht auftrat, war es nun möglich, denjenigen Komplex bei der alkalischen Hydrolyse zu suchen, welcher Tryptophan enthält und auf diese Weise zu ermitteln, mit welchen Aminosäuren das Tryptophan im Eiweiß zunächst verkettet ist. Diese Untersuchung wurde durch den Umstand sehr erleichtert, daß wir wahrnehmen konnten, daß bei der alkalischen Hydrolyse, wie auch immer sie ausgeführt werden mag, der tryptophanhaltige Komplex genau wie Tryptophan selbst mit dem Hopkinsschen[1]) Reagens, einer Lösung von Quecksilberoxydsulfat in 10 proz. Schwefelsäure, fast quantitativ gefällt werden kann. Man kann jeweilig alle Untersuchungen genau mit der sehr feinen Reaktion auf Tryptophan von Adamkiewicz und Hopkins[2]) verfolgen, die Tryptophan sowohl im freien Zustande als auch in seinen Verbindungen anzeigt. Man fügt zu der zu untersuchenden Lösung einige Tropfen Glyoxylsäure, unterschichtet hierauf mit konzentrierter Schwefelsäure und kann nun an der Schichtungszone selbst bei kleinsten Mengen eine rot-violette Farbenreaktion beobachten.

Um das tryptophanhaltige Peptid zu fassen, sind wir in der Weise vorgegangen, daß wir vorerst Casein, nach Hammarsten dargestellt, welches mit einem Tryptophangehalt von 0,65%, wie schon H. Fasal[3]) im hiesigen Institute zeigte, zu den tryptophanreichsten Eiweißkörpern zählt, mit gesättigter Ätzbarytlauge hydrolysierten. An der Hand der Glyoxylsäurereaktion verfolgten wir nun die Hydrolyse zu verschiedenen Zeiten, nach 2, 4, 9, 13, 17 und 20 Stunden nahmen wir Proben und konnten sehen, daß die Reaktion immer stark positiv verlief und nur ein ganz schwaches Abklingen zu bemerken war. Wir haben bei unseren Versuchen weiter gesehen, daß man zu gleichen Resultaten und in bequemerer Weise kommt, wenn man die Hydrolyse mit Ätzkali (10 proz.) durchführt und auch hier die Reaktion wie oben angegeben verläuft.

Bei der Darstellung des tryptophanhaltigen Komplexes verfuhren wir folgendermaßen. 500 g Casein (Hammarsten) werden 24 Stunden lang in einem Blechtopfe mit 2 Litern 10 proz. Kali-

[1]) Hopkins und Cole, Journ. of physiol. 27, 418—428.

[2]) Hopkins, Proc. roy. soc. 68, 21—33.

[3]) H. Fasal, diese Zeitschr. 44, Heft 5/6, S. 397.

Digitized by Google

lauge in der Siedehitze hydrolysiert, wobei man das hierbei verdampfende Wasser jeweils ersetzt. Nach dem Unterbrechen der Hydrolyse läßt man vorerst das Reaktionsprodukt vollkommen erkalten und neutralisiert sehr vorsichtig unter guter Eiskühlung in einem geräumigen Gefäße, am besten einem 10 l fassenden Gurkenglase, um ein Überschäumen zu vermeiden, mit 50 proz. Schwefelsäure, schließlich übersäuert man ein wenig. Nach dem Absitzenlassen der gebildeten Niederschläge filtriert man rasch ab und wäscht mit 10 proz. Schwefelsäure und schließlich mit destilliertem Wasser, bis die Waschflüssigkeit keine Reaktion mit Glyoxylsäure und konz. Schwefelsäure zeigt. Der schmutzigbraune Niederschlag selbst erweist sich als frei von Tryptophan, da er die Glyoxylsäure-Schwefelsäurereaktion nicht gibt, und wird daher nicht weiter untersucht. Das Filtrat versetzen wir nun mit dem Hopkinsschen Reagens, einer 10 proz. Lösung von Mercurisulfat in 10 proz. Schwefelsäure, so lange bis keine weitere Fällung zu beobachten ist. Der hierbei ausfallende Niederschlag ist von citronengelber Farbe, amorph, sehr dicht und setzt sich nach 12stündigem Stehen vollkommen am Boden ab. Mit dem Quecksilberreagens wird eventuell noch nachgefällt und dann der Niederschlag abfiltriert. Bei manchen Versuchen setzt sich nach 24stündigem Stehen aus der Mutterlauge noch eine Portion ab; das Filtrat zeigt noch schwach die Adamkiewicz-Hopkinssche Reaktion und wird wieder mit dem Quecksilberreagens versetzt, der entstehende Niederschlag abfiltriert und mit dem ersten vereinigt. Den Vorgang setzt man so lange fort, bis sich in den Mutterlaugen mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure keine Tryptophanreaktion mehr erzielen läßt. Einige Male gelang es uns, die Fällung gleich quantitativ durchzuführen. Der citronengelbe Niederschlag wird nun gut mit 10 proz. Schwefelsäure und dann mit Wasser ausgewaschen und zeigt eine sehr starke Glyoxylsäurereaktion. Hierauf schlämmt man ihn mit Wasser auf, fügt ein dreimal mit siedendem Wasser gut ausgewaschenes Bariumkarbonat hinzu, um die beim Einleiten von Schwefelwasserstoff frei werdende Schwefelsäure zu neutralisieren, und zerlegt den Quecksilberniederschlag durch Einleiten von Schwefelwasserstoff so lange, bis eine entnommene Probe, abfiltriert, im Filtrat mit Schwefelammonium keine Schwarzfärbung gibt. Nach 24—32 Stunden ist gewöhnlich die Zersetzung beendet. Nun filtriert man vom Niederschlag ab, der

Digitized by Google

gewöhnlich kolloidal ist und daher öfters durchs Filter gegossen werden muß, wäscht mit Wasser bis zum Aufhören der Adamkiewicz-Hopkinsschen Reaktion gut aus, schlämmt den Niederschlag nochmals mit Wasser auf, fügt wieder mit siedendem Wasser gewaschenes Bariumcarbonat hinzu und leitet wieder Schwefelwasserstoff ein. Den abermals entstehenden Niederschlag filtriert man ab, wäscht wieder gut mit Wasser, bis zum Aufhören der Tryptophanreaktion, nach, vereinigt beide Filtrate und engt sie nun im Vakuum im Wasserstoffstrome unter Zusatz von wenig mit siedendem Wasser gewaschenem Bariumcarbonat zwecks Neutralisation auf ein geringes Volumen ein, filtriert von dem etwa sich noch ausscheidenden kolloidal im Filtrate zurückgehaltenen Sulfiden ab, und versetzt dann die dunkelbraun bis rotbraun gefärbte Lösung so lange mit 95 proz. Alkohol bis nichts mehr ausfällt. Dabei scheidet sich ein lichtbrauner Niederschlag ab, den man so lange mit Alkohol nachwäscht, bis er keine Glyoxylsäurereaktion gibt. Das alkoholische Filtrat, das die Tryptophanreaktion mit Glyoxylsäure sehr stark zeigt, engt man nun abermals im Vakuum im Wasserstoffstrome fast bis zur Sirupkonsistenz ein und nimmt den Destillationsrückstand mit wenig Alkohol in der Wärme auf dem Wasserbade auf. Hierauf gießt man die Lösung möglichst quantitativ in ein schlankes Becherglas, versetzt sie mit dem Doppelten ihres Volumens mit Alkohol und überläßt sie in der Kälte sich selbst. Es setzt sich nach 12 bis 24stündigem Stehen ein weißer bis hellgelber Körper ab, der abfiltriert und bis zum Verschwinden der Glyoxylsäurereaktion mit Alkohol gut gewaschen wird. Man engt wieder im Vakuum ein, nimmt mit Alkohol auf und wiederholt so den vorher beschriebenen Vorgang einige Male. Man erhält so mit Alkohol immer Niederschläge, die keine Glyoxylsäurereaktion zeigen. Da man also auf diesem Wege nicht den tryptophanhaltigen Komplex isolieren kann, aber viele Substanzen entfernt, die nicht tryptophanhaltig sind, engt man das zuletzt erhaltene alkoholische Filtrat im Vakuum im Wasserstoffstrome bis zur Sirupdicke ein und nimmt den Sirup mit absolutem Methylalkohol auf.

Die so erhaltene Lösung läßt man 24 Stunden in der Kälte stehen, es scheidet sich ein weißlichgelber Niederschlag ab, den man abfiltriert und mit absolutem Methylalkohol nachwäscht, bis er keine Adamkiewicz-Hopkinssche Reaktion mehr zeigt. Das

Digitized by Google

Filtrat, das sie sehr stark gibt, wird nun im Vakuum im Wasserstoffstrome wieder bis zu einem Sirup eingeengt und dieser abermals mit absolutem Methylalkohol aufgenommen. Der in ein längliches Becherglas gegossene Kolbeninhalt wird 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen. Dabei scheidet sich ein weißer Körper ab, der trotz gutem Waschen mit absolutem Methylalkohol die Glyoxylsäurereaktion zeigt. Da wir aber bei zwei Versuchen nur eine ganz geringe Ausbeute von ihm erhielten und uns kein weiteres Ausgangsmaterial (reines Casein) zur Verfügung stand, mußten wir von seiner Analyse und weiteren Hydrolyse absehen. Er ist ebenso, wie der weiter unten von uns erhaltene Körper ein Bariumsalz, was wir durch die Flammenfärbung und die Schwefelsäurereaktion feststellen konnten.

Das Filtrat, das in hohem Maße die Adamkiewicz-Hopkinssche Reaktion zeigt, wird nun so lange mit Äther versetzt, bis es weiter keine Fällung gibt. Der hierbei entstehende Niederschlag fällt weiß und amorph. Er wird scharf abgenutscht, mit wenig Äther gewaschen und zerfließt dabei an der Luft unter Braunfärbung. Im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet, wird er fest und grob-krystallinisch. Der Körper zeigt zwischen 175—195° ein Zersetzung und wird durch nochmaliges Lösen in wenig absolutem Methylalkohol und abermaliges Fällen mit Äther gereinigt, nachdem man vorher von einer ganz geringen Spur von Verunreinigung abfiltriert. Der Zersetzungspunkt des Körpers ist unverändert 175—195°, nachdem er vorher im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure getrocknet wurde. Er ist ein Bariumsalz (Flammenfärbung und Schwefelsäurereaktion) und enthält den Tryptophankomplex (Adamkiewicz-Hopkinssche Reaktion mit Glyoxylsäure und Schwefelsäure), gibt aber die Bromreaktion des Tryptophan selbst nicht. Er gibt schwache Biuretreaktion, ein Beweis für das Vorhandensein einer kürzeren Peptidkette, denn zur Hervorrufung der Reaktion bedarf es mindestens zweier Gruppen —CO—$\underline{N}H_2$, welche an einem Kohlenstoff oder Stickstoff oder miteinander gebunden sind. Im Vakuumexsiccator über Schwefelsäure wird er zur Gewichtkonstanz getrocknet und dann analysiert.

0,1960 g Subst.: 0,0360 g $BaSO_4$. — 0,1905 g Subst.: 0,0353 g $BaSO_4$; 0,1304 g Subst.: 12,3 ccm N (21,5°, 739 mm); 0,1318 g Subst.: 12,6 ccm N (22°, 745 mm); 0,1623 g Subst.: 0,2803 g CO_2, 0,0872 g H_2O; 0,1623 g Subst.: 0,2816 g CO_2, 0,0883 g H_2O.

Digitized by Google

Ber. für: $C_{50}H_{76}N_{10}O_{20}Ba$.

Ba: 10,79 %; N: 10,98 %; C: 47,06 %; H: 6,19 %

Gef.: Ba: 10,88 %, 10,87 %; N: 10,65 %, 10,75 %; C: 47,10 %, 47,32 %; H: 6,05 %, 6,09 %.

Der hohe Sauerstoffwert deutet auf Krystallwasser, dessen Bestimmung so vorgenommen wurde, daß man die Substanz bei 115° im Thermostaten zur Gewichtskonstanz trocknete. 0,2385 g Substanz verloren 0,04201 g H_2O.

Ber. für 12 Mol. H_2O 16,98%

Gef. „ 12 „ „ 16,86%.

Das gefundene Resultat sagt uns, daß das Bariumsalz 12 Moleküle Krystallwasser enthält.

Bestimmung des Tryptophangehaltes.

Um seinen weiteren Bau kennenzulernen, machten wir nach der Methode H. Fasals[1]), die im hiesigen Institute ausgearbeitet wurde, auf colorimetrischem Wege mit Hilfe der Adamkiewicz-Hopkinsschen Reaktion eine Tryptophanbestimmung, die uns zeigte, daß das Salz 4 Tryptophanreste, das freie Peptid also 2 enthielt.

Eingewogen wurden 0 0034 g Substanz, 2 ccm Glyoxylsäurelösung und 6 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt. Die Reaktion wurde verglichen mit der Standardlösung 1 GW. Tryptophan: 1000 GW. Wasser.

Am Colorimeter (Duboscq) Standardlösung: 12 Teilstriche

Bariumsalzlösung: 26 „

Folglich enthält das Bariumsalz des Peptids um 2,18 mal mehr Tryptophan als die Standardlösung.

0,0034 g

$0{,}034 : 0{,}001 = 100 : x$

$x = 29{,}4.$

$29{,}4 \cdot 2{,}18 = 64{,}1138.$

Ber. für 4 Mol. Tryptophan 63,91%

Gef. „ 4 „ „ 64,11%.

Unter Voraussetzung, daß die Kette nur eine Carboxylgruppe enthält, muß man annehmen, daß zwei Peptidketten mit einem Atom Barium verbunden sind.

Bestimmung der NH_2-Gruppe.

Um nun feststellen zu können, wie viele freie Aminogruppen die Kette enthält, wurde die van Slyksche[2]) Methode zur Bestimmung von freien Aminogruppen durchgeführt, die uns zeigte, daß das Bariumsalz zwei enthält, das freie Peptid also eine Aminogruppe unter der oben gemachten Annahme.

0,7360 g Subst. 24,1 ccm N (22,5°, 748 mm) Amido-N 12,05 ccm

Ber. für 2 NH_2-Gruppen 2,15% N

Gef. „ 2 „ 1,81 N.

[1]) H. Fasal, diese Zeitschr. **44**, Heft 5/6, S. 394. 1912.

[2]) van Slyke, Journ. of Biolog. Chem. 1911.

Digitized by Google

Ein Versuch, aus dem Bariumsalz die freie Säure darzustellen, indem wir eine genau abgewogene Menge Substanz, in Methylalkohol gelöst, mit der für das Barium genau berechneten Menge $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure versetzten, vom ausfallendem Bariumsulfat abfiltrierten und dann Äther zur Lösung gaben, führte zu einem braunen, nicht krystallisierbaren amorphen Sirup. Das uns vorliegende Bariumsalz zeigt außer der Tryptophanreaktion nur sehr schwache Biuretreaktion, das beweist, daß eine, wenn auch kurze, Peptidkette vorliegt. — Mit dem Millonschen Reagens gibt es keine Rotfärbung, sondern nur eine braune Fällung. Alle diese Untersuchungen zeigen uns aber klar, daß wir in $C_{50}H_{52}N_{10}O_8Ba$ 12 H_2O das Bariumsalz eines tryptophanhaltigen Tripeptids der Bruttoformel $C_{25}H_{27}N_5O_7$ in Händen haben, in dem zwei Tryptophanreste und noch eine Aminosäure säureamid-artig, wie im Eiweiß überhaupt, verkettet sind. Es ist jetzt nur mehr die Frage offen, welche Aminosäure es ist, die mit den beiden Tryptophanresten in der Peptidkette $C_{25}H_{27}N_5O_4$ verbunden ist. Zu diesem Zwecke unterwarfen wir das Bariumsalz des Tripeptids einer weitergehenden Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure, die wir auf folgende Art durchführten.

Im einem Rundkölbchen mit eingeschliffenem Steigrohre wurden 1,8320 g Substanz 6 Stunden lang mit der 4fachen Menge konzentrierter Salzsäure hydrolysiert, in dem bei ganz kleiner Flamme das Reaktionsgemisch in geringem Sieden gehalten wurde. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolyseprodukt, das sich durch die aus den Tryptophanresten gebildeten Huminsubstanzen sehr dunkel gefärbt hat, mit Wasser in eine Porzellanschale gespült und nun auf dem Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz eingedampft; diese Operation wurde so oft wiederholt, bis der Geruch von Chlorwasserstoffsäure verschwunden war. Dann wurde mit heißem Wasser aufgenommen und zur Entfärbung mit Tierkohle aufgekocht. Die Tierkohle wurde vorher durch Auskochen mit konzentrierter Salzsäure und Auswaschen mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gereinigt. Nach dem Aufkochen wurde abfiltriert, drei- bis viermal mit siedendem Wasser gewaschen und nun der Tierkohlenniederschlag mit siedendem Wasser ausgekocht, um etwaige, von der Tierkohle zurückgehaltene Substanz nicht zu verlieren, dann wurde wieder mit heißem Wasser nachgewaschen und schließ-

Digitized by Google

lich im Vakuum auf ein geringes Volumen eingeengt. Der Destillationsrückstand wurde, um die fragliche Aminosäure besser fassen zu können, nach Schotten-Baumann benzoyliert, doch nicht unter Zusatz von Natronlauge, sondern von festem Natriumbicarbonat nach der allgemein für Aminosäuren anwendbaren Methode von Emil Fischer[1]), demzufolge Natriumbicarbonat viel linder und auf die sich bildenden Benzoylverbindungen nicht so stark verseifend einwirkt wie Lauge. Im übrigen wurde wie sonst nach Schotten-Baumann verfahren. Das Natriumcarbonat wurde abfiltriert, mit heißem Alkohol öfters dekantiert und der Alkohol abgedampft, doch erwiesen sich beide Rückstände als stickstofffrei. Nun wurde das Filtrat angesäuert und die Benzoesäure mit Äther entfernt. Sie zeigt ihren genauen Schmelzp. von 122,5° und erwies sich zugleich als stickstofffrei. Das saure Filtrat wurde nun mit Natriumbicarbonat und Sodalösung versetzt, bis es gerade gegen Kongo neutral reagiert und im Vakuum eingeengt. Dabei scheidet sich Kochsalz frei von organischer Substanz ab (Prüfung mit dem Platinspatel auf Brennbarkeit!), von dem abfiltriert wurde. Diese Operation wurde öfters wiederholt. Schließlich wurde vor dem weiteren Einengen mit dem doppelten Volumen der Lösung mit Alkohol versetzt und auch diese Operation öfters wiederholt. Dabei wurde immer Natriumchlorid und benzoesaures Natrium abgeschieden, bis schließlich eine wässerig-alkoholische Lösung von ganz geringem Volumen erhalten wurde. Die immer bis zu diesem Momente stets neutral gehaltene Lösung wurde mit ganz wenig verdünnter Salzsäure bis zur kongosauren Reaktion angesäuert. Nach 12stündigem Stehen haben sich Krystalle abgeschieden, von denen abfiltriert wurde und die sich als stickstoffhaltig erwiesen. Man krystallisiert sie aus ganz wenig heißem Wasser um. Das vorher erhaltene Filtrat wurde mit Äther ausgeschüttelt, in den aber nichts hineingeht, der eingeengte wässerige Anteil erwies sich auch als stickstofffrei. Die erhaltenen Krystalle zeigten einen scharfen Schmelzpunkt von 163° und wurden nochmals aus heißem Wasser umkrystallisiert, der Schmelzp. blieb konstant 163°.

Dieser Umstand läßt uns erkennen, daß wir das d-l-Benzoylalanin in Händen haben, wie es in der Literatur allgemein

[1]) Emil Fischer, Berichte d. D. Ch. G. **32**, 2454. 1899

Digitized by Google

beschrieben wird. Das d-l-Benzoylalanin[1]) löst sich in 250 Teilen kalten Wassers, leichter in heißem, aus gesättigten Lösungen scheidet es sich in sechsseitigen Blättchen aus. In Alkohol ist es leicht, in Äther schwer löslich und schmilzt bei 162—163°. Alle diese Eigenschaften stimmen mit unserem Benzoylkörper überein, der dritte Baustein also, aus dem sich unser Tripeptid zusammensetzt, ist das Alanin, was sich auch durch die Auswertung unserer Analysenresultate bestätigt, wie weiter unten gezeigt werden soll. Zu einer Analyse des Benzoylderivates stand uns leider nicht genügend Material mehr zur Verfügung, wie wir überhaupt bei unserer ganzen Arbeit unter dem Mangel an Ausgangsmaterial zu leiden hatten, da Casein hier nicht zu beschaffen ist und wir unsere Untersuchungen mit einem Casein anstellten, das wir der Güte des Herren Professor Sörensen in Kopenhagen verdanken. Auch ist die Ausbeute selbst bei Anwendung von 500 g Casein sehr gering. Abderhalden[2]) erhielt bei seinen Versuchen über Tryptophan nur 0,5% Ausbeute, so daß wir beim Tripeptid nicht viel mehr zu erwarten hatten, wie es sich auch tatsächlich bei unseren Versuchen zeigte.

Da wir die Hydrolyse des Eiweißkörpers in alkalischer Lösung vornahmen, stand zu erwarten, daß wir durch den racemisierenden Einfluß der Hydroxylionen das optisch-inaktive Tripeptid erhalten würden, wovon wir uns auch durch eine Untersuchung des optischen Drehungsvermögens des Bariumsalzes überzeugen konnten.

Zusammenfassung.

Wir sehen also, daß es uns gelungen ist, bei alkalischer Hydrolyse des tryptophanhaltigen Caseins nach der oben beschriebenen Methode das optisch inaktive Bariumsalz eines tryptophanhaltigen Tripeptids aus dem Eiweißkörper abzubauen, in dem zwei Tryptophanreste und eine α-Aminopropionsäure säureamideartig verkettet sind, wie uns die van Slyke sche Bestimmungsmethode der freien Aminogruppen zeigte; denn wenn das Bariumsalz mit 12 Mol. Krystallwasser die Zusammensetzung $C_{50}H_{52}N_{10}O_8Ba$ hat, hat das freie Peptid die Zusammensetzung $C_{25}H_{27}N_5O_4$. Unter der

[1]) I. Baum, Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 467. 1885. — Karl Brenzinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie **16**, 579. 1892.

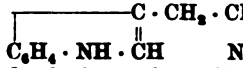
[2]) Abderhalden und Kempe, Zeitschr. f. physiol. Chemie **52**, 209. 1907.

Digitized by Google

Annahme, daß zwei Mol. Tryptophan $C_{11}H_{12}N_2O_2$ und ein Mol. Alanin $C_3H_7NO_2$ in ihm in säureamidartiger Verkettung unter Austritt von zwei Mol. Wasser verknüpft sind, ergibt sich eine Zusammensetzung von $C_{25}H_{27}N_5O_4$, was mit den oben angegebenen Analysenresultaten vollkommen übereinstimmt.

Für die Zusammensetzung des Tripeptids sind nun folgende Möglichkeiten nach der üblichen Nomenklatur Emil Fischers gegeben: 1. d-l-Tryptophyl-tryptophyl-alanin, — 2. d-l-Alanyl-tryptophyl-tryptophan und 3. d-l-Tryptophyl-alanyl-tryptophan. Welche von diesen drei Möglichkeiten in unserem Falle zutrifft, ließe sich nur sagen, wenn man das Bariumsalz der partiellen Fermenthydrolyse unterwerfen würde oder wenn es gelänge, das Peptid aus seinen einzelnen Bausteinen synthetisch aufzubauen und es bleibt die weitere Aufgabe, durch Spaltung und Synthese diesen Komplex gänzlich aufzuklären.

In der Literatur finden wir folgende Polypeptide, die unserem Tripeptid ähnlich aufgebaut sind: 1. das von Emil Fischer und Abderhalden[1]) dargestellte d-l-Alanyl-d-tryptophan, ein amorpher Körper; 2. das von den gleichen Forschern dargestellte d-Alanyl-d-Tryptophan[2])



das nicht krystallisierte, aber durch ein gut krystallisierende Kupfersalz charakterisiert ist, und schließlich 3. das von Abderhalden und L. Baumann dargestellte d-l-Alanyl-d-Tryptophan-Anhydrid[3]) von der Zusammensetzung $C_{14}H_{15}O_2N_3$, das aus 50proz. Alkohol in zu Büscheln vereinigten Blättchen krystallisiert, Schmelzpunkt 280° (korr. 290°) unter Braunfärbung.

[1]) Emil Fischer und Abderhalden, Ber. 40, S. 2744. 1907.
[2]) Emil Fischer und Abderhalden, Ber. 40, S. 2744. 1907.
[3]) Abderhalden und L. Baumann, Ber. 40, S. 2859. 1908.

Digitized by Google

Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. I.

Von

E. Freudenberg und **P. György.**

(Aus der Kinderklinik in Heidelberg.)

(Eingegangen am 27. Juli 1920.)

I. Einleitung.

Im Jahre 1904 wurden durch Pfaundler[1][2]) Versuche veröffentlicht, aus denen hervorging, daß tierisches Gewebe, namentlich Knorpelsubstanz, in $CaCl_2$-Lösung eingelegt, eine Abnahme im Ca-Ionengehalt der Lösung bedingen, der eine entsprechende Cl-Abnahme nicht gegenübersteht. Der Kalkverlust betrug bis über 50% des eingebrachten Ca. Er wurde auch bei der Durchspülung ganzer Extremitäten von Hunden und von Kinderleichen nachgewiesen. Nach Ausschluß autolytischer und bakterieller Vorgänge und einer Kalkausfällung in der Lösung durch ausdiffundierende Gewebsstoffe führte Pfaundler den Vorgang auf Adsorption von Ca-Ionen zurück. Er wies hierbei auf die auch jetzt noch sehr wenig zahlreich bekannten Beispiele von Adsorption unter Hydrolyse des Adsorbendums in nichtäquivalenten Mengen der durch die Hydrolyse entstandenen Produkte hin. Die Annahme einer Adsorption wurde wegen der Abhängigkeit der Größe des Ca-Verlustes von der Ca-Konzentration gemacht.

Nach den neueren Anschauungen dürfte die Gegenüberstellung Adsorption — chemische Bindung das hier vorliegende Problem nicht in seinem Wesen erfassen. Durch Versuche von Rona und György[3]) wurde gezeigt, daß die Bindung eines anorganischen Anions, Cl^-, an die Serumkolloide eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration ist, und daß diese Bindung sich in der Größenordnung analytisch sicher nachweisbarer Beträge bewegt.

Die Bindung eines Kations, des Na^+, an die Serumkolloide ist schon

[1]) Jahrb. f. Kinderheilk. **60**. 1904.

[2]) Hartmann, Sitzungsber. Kgl. bayr. Akad. d. Wissensch. math.-phys. Kl. 1913, S. 271.

[3]) Diese Zeitschr. **56**. 1913.

Digitized by Google

länger durch die Arbeiten von Zuntz[1]), Hamburger[2]) und Gürber[3]) bekannt und mit moderner Methodik durch Rona und György[4]) bestätigt worden. Es kann angenommen werden, daß 5—15% des Gesamtalkalis des Serums „gebunden" sind. Der Anteil im Serum gebundenen Kalks dagegen kann nach Rona und Takahashi[5]) sogar auf 30% geschätzt werden.

Die Bindung sowohl von Anionen wie Kationen an Gelatine ist mit physikalisch-chemischen Methoden in neuester Zeit von J. Loeb[6]) in seinen Untersuchungen über amphotere Kolloide geprüft worden. Es wurde festgestellt, daß auf der sauren Seite vom isoelektrischen Punkt amphotere Elektrolyte nur Anionen von Neutralsalzen, auf der mehr alkalischen Seite nur Kationen binden können. Am isoelektrischen Punkt selbst ist keinerlei Bindung möglich. Gelatine ist dann nicht ionisiert. Die Bindung von Kationen verläuft so, daß oberhalb des isoelektrischen Punktes ein rascher Anstieg der gebundenen Menge erfolgt, der ziemlich bald ein Maximum erreicht. Während, allgemein gesprochen, eine leichte Verschiebung des p_H beim isoelektrischen Punkt die physikalischen Eigenschaften der Gelatine-Ionenverbindungen stark beeinflußt, ist der Einfluß bei wesentlich größerem oder kleinerem p_H geringer. Die analytisch festzustellende Menge jener Ionen-Gelatineverbindungen stellt sich mit den Änderungen der physikalischen Eigenschaften gleichsinnig ein, wenn p_H geändert wird. Beim isoelektrischen Punkt unterbleibt jede Bindung, die Kurven der physikalischen Eigenschaften weisen Minima auf. Nach Loeb ist dies Verhalten unvereinbar mit der Annahme von Adsorptionsverbindungen und nur als chemische Bindung verständlich. Wie zu erwarten, bindet die gleiche Menge Gelatine doppelt soviel einwertige als zweiwertige Kationen. In den physikalischen Eigenschaften (außer der Leitfähigkeit) bestehen gesetzmäßige Unterschiede zwischen ein- und zweiwertigen Kationen. Entsprechend verhalten sich verschiedenwertige Anionen.

Auf Grund dieser Befunde war eine Prüfung der Kalkbindung an tierisches Gewebe in ihrer Abhängigkeit vom p_H erforderlich. Weiter haben wir bei konstantem p_H die Kalkbindung als Konzentrationsfunktion der Ca-Menge geprüft.

II. Bemerkungen zur Methodik.

Der untersuchte Knorpel stammte teils als Rippen- und Brustbeinknorpel von Kälbern und wurde frisch vom Schlachthof bezogen, teils diente menschlicher Knorpel — vorwiegend von Föten und Kinderleichen —, wie der tierische sorgfältig präpariert und zerkleinert, zur Untersuchung. Er wurde in einem Teil der Versuche in frischem Zustande, teilweise auch in getrockneter und feingemahlener Form verwendet. Durch Acetatgemische

[1]) Inaug.-Diss. Bonn 1868.

[2]) Zeitschr. f. Biol. **28**. 1892.

[3]) Sitzungsber. d. phys.-med. Ges. Würzburg 1895.

[4]) a. a. O.

[5]) Diese Zeitschr. **31**. 1911 und **49**. 1913.

[6]) Journ. of General Physiology Nr. 1 u. 2, 1918, Nr. 3, 4, 5, 1919.

Digitized by Google

nach Michaelis[1]) wurde die Erhaltung konstanter Reaktion angestrebt, Diese konnten wir allerdings nur im Zwischenraum von 4,8—6,5 erreichen. Bei den stärker sauren Reaktionsstufen, deren Pufferwirkung natürlich geringer ist, wurden die Gemische am Versuchsende stets alkalischer. Ebenso groß waren die Schwierigkeiten, Konstanz von $p_H > 6{,}7$ zu erreichen. Hier stellte schon die Ausfällbarkeit der Ca-Salze gewisse Grenzen. Da Phosphat-, Citrat- und Boratgemische für unsere Zwecke nicht in Betracht kamen, bedienten wir uns der Standardglykokollmischungen nach Sörensen. Die Pufferwirkung reichte hier aber wiederum für unseren Zweck nicht aus, die elektrometrische Kontrolle ergab jedesmal ein Absinken des p_H. Wir begnügten uns damit, p_H zu Beginn und zu Ende jedes Versuchs festzustellen. Wir haben mehrmals auf die Glykokollgemische verzichtet und unseren $CaCl_2$-Lösungen kleine Mengen NaOH zugefügt, wobei p_H vor und nach dem Versuch gemessen wurde.

Die Cl-Bestimmung in unseren Gemischen haben wir nach Abdampfen und Verkohlung abgemessener Mengen nach Volhard, die Ca-Bestimmungen nach Veraschung, Lösen in verdünnter Salzsäure durch Fällung als Ca-Oxalat bei schwach ammoniakalischer Reaktion, durch Glühen und Titration als CaO gegen Methylorange als Indicator ausgeführt. Zur Analyse kamen jeweils 10 ccm. Während der Versuche wurde stets reichlich Xylol zur Vermeidung bakterieller Zersetzung des Knorpels verwendet. Wir arbeiteten nur bei Zimmertemperatur.

Die p_H-Messungen wurden unter Benutzung einer Meßbrücke, der gesättigten Calomelelektrode als Ableitungselektrode unter Anwendung der von Michaelis[2]) beschriebenen Elektrodenform bei stehender Wasserstoffatmosphäre ausgeführt.

III. Experimenteller Teil.

In einer Reihe von Vorversuchen wurden zunächst die geeignetsten Reaktionszeiten, $CaCl_2$-Konzentrationen und der Einfluß starker Reaktionsverschiebungen geprüft. Erst dann gingen wir dazu über, unter den geeigneten Bedingungen eine größere Anzahl von Aciditätsstufen einzuführen.

Von den wiedergegebenen p_H-Zahlen bedeutet die erste den Wert zu Beginn, die zweite am Ende des Versuches.

Versuch I: 6. bis 9. VI. 1920. Je 5 g getrockneten Kalbsknorpels kommen zu 50 ccm der Acetatgemische. Es wurde überall 1 ccm einer rund 10proz. $CaCl_2$-Lösung beigefügt.

p_H	6,7—6,5	5,5—5,5	4,0—4,5	3,1—4,7
Normalität an $CaCl_2$ vor Versuch	0,0272	0,0272	0,0272	0,0272
Cl-Normalität nach Versuch . .	0,0384	0,0370	0,0366	0,0364
Ca-Normalität nach Versuch . .	0,0096	0,013	0,017	0,020
Ca-Bindung	0,0176	0,0142	0,0102	0,0072
Ca-Bindung in %	64,7	52,2	36,9	26,5

[1]) Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914.

[2]) a. a. O.

Digitized by Google

Ergebnis: Mit sinkendem p_H abnehmende, durchweg sehr starke Ca-Bindung. Da es nicht gelingt, stark saure Reaktionen ($p_H < 4{,}0$) konstant zu halten, ist auch in diesem Bereiche Bindung nachweislich.

Versuch II: 11. bis 16. VI. 1920. Je 16,5 g frischer Menschenknorpel angesetzt wie oben.

p_H	6,7—6,7	5,0—5,3	3,1—4,9
Normalität an $CaCl_2$ vor Versuch[1])	0,0221	0,0221	0,0221
Cl-Normalität nach Versuch	0,0310	0,0320	0,0210
Ca-Normalität nach Versuch	0,0024	0,0094	0,0092
Ca-Bindung	0,0197	0,0127	0,0129
Ca-Bindung in %	89,1	57,5	58,4

Ergebnis: Sehr starke Bindung, besonders bei mehr alkalischer Reaktion.

Versuch III: 14. bis 16. VI. 1920. Je 5 g bei 120° getrockneten Kalbsknorpels. Anordnung wie Versuch II.

p_H	6,7—6,3	5,5—5,4	4,0—4,5	3,1—4,8
$CaCl_2$-Normalität vor Versuch	0,0270	0,0270	0,0270	0,0270
Cl-Normalität nach Versuch	0,0402	0,0434	0,0324	0,0328
Ca-Normalität nach Versuch	0,0236	0,0240	0,0248	0,0256
Ca-Bindung	0,0034	0,0030	0,0022	0,0014
Ca-Bindung in %	12,6	11,1	8,1	5,2

Ergebnis: Schwache, mit sinkendem p_H abnehmende Ca-Bindung. Erhitzen des Knorpels schädigt also das Ca-Bindungsvermögen

Versuch IV: 18. bis 23. VI. 1920. Je 4 g trockner Menschenknorpel. 2 ccm rund 10 proz. $CaCl_2$-Lösung auf 48 ccm Gemisch.

p_H	7,8—6,7	6,7—6,4	5,5—5,8	3,1—4,8
$CaCl_2$-Normalität vor Versuch	0,0560	0,0560	0,0560	0,0560
Cl-Normalität nach Versuch	0,0572	0,0510	0,0560	0,0550
Ca-Normalität nach Versuch	0,0388	0,0384	0,0456	0,0462
Ca-Bindung	0,0172	0,0176	0,0104	0,0098
Ca-Bindung in %	30,7	31,4	18,6	17,5

Ergebnis: Abnehmende Bindung mit fallendem p_H.

Versuch V: 8.—11. VII. 1920. Je 14 g frischer Menschenknorpel. Anordnung wie im letzten Versuch.

p_H	10,5—6,9	6,7—6,3	5,0—5,1	3,0—5,0
$CaCl_2$-Normalität vor Versuch[2])	0,0520	0,0520	0,0520	0,0520
Cl-Normalität nach Versuch	0,0512	0,0530	0,0516	0,0484
Ca-Normalität nach Versuch	0,0252	0,0276	0,0330	0,0431
Ca-Bindung	0,0268	0,0244	0,0190	0,0089
Ca-Bindung in %	51,5	46,9	36,5	16,9

Ergebnis: Abnehmende Ca-Bindung mit sinkendem p_H. Überlegenheit frischen Knorpels gegenüber trockenem.

[1]) Unter Berücksichtigung eines Wassergehaltes des Knorpels von 70%.

[2]) Unter Berücksichtigung des Knorpelwassergehaltes.

Digitized by Google

Versuch VI: 4. bis 7. VI. 1920. Je 15 g frischer Gehirnrindenmasse.

p_H	6,7—6,5	6,1—6,0	5,0—5,0	4,0—4,4	3,1—4,7
$CaCl_2$-Normalität vor V.[1])	0,0227	0,0227	0,0227	0,0227	0,0227
Cl-Normalität nach V.	0,0322	0,0316	0,0312	0,0320	0,0290
Ca-Normalität nach V.	0,0480	0,0168	0,0200	0,0206	0,0266
Ca-Bindung	0,0047	0,0059	0,0027	0,0021	0,0039
Ca-Bindung in % . .	20,7	25,9	11,9	9,3	—17,2

Ergebnis: Mit sinkendem p_H abnehmende Ca-Bindung, besonders rasche Abnahme bei p_H 5,0. Ausdiffundieren bei p_H 3,1—4,7.

Versuch VII: 11. bis 15. VI. 1920. Je 5 g Gehirntrockenpulver eines alkoholgehärteten Gehirnes.

p_H	6,7—5,9	5,5—5,2	4,0—4,6	,31—3,9
$CaCl_2$-Normalität vor Versuch .	0,0272	0,0272	0,0272	0,0272
Cl-Normalität nach Versuch . .	0,0452	0,0444	0,0382	0,0362
Ca-Normalität nach Versuch . .	0,0177	0,0186	0,0250	0,0258
Ca-Bindung	0,0098	0,0086	0,0022	0,0014
Ca-Bindung in %	36,0	31,6	8,1	5,1

Ergebnis: Mit abnehmenden p_H fallende Ca-Bindung, scharfer Abfall zwischen p_H 5,2 und 4,6.

Versuch VIII: 21. bis 25. VI. 1920. Je 15 g frische Gehirnmasse.

p_H	11,0—6,6	6,7—6,2	5,5—5,5	4,0—4,6	3,1—4,5
$CaCl_2$Normalität vor V.[1])	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466
Cl-Normalität nach V.	0,0542	0,0508	0,0488	0,0442	0,0506
Ca-Normalität nach V.	0,0370	0,0454	0 0488	0,0482	0,0484
Ca-Bindung	0,0096	0,0012	—0,0022	—0,0016	—0,0018
Ca-Bindung in % . .	19,9	17,0	—5,5	—4,2	—4,1

Ergebnis: Oberhalb p_H 5,5 Ca-Bindung, unterhalb Ausdiffundieren von Ca.

Nunmehr wurde die Wirkung verschiedener Ca-Konzentrationen auf die Kalkbindung durch Knorpel geprüft. Es wurden steigende Mengen, 0,5 bis 5,0 ccm, ungefähr 10 proz. $CaCl_2$-Lösung zur Acetatmischung, meist 45 ccm, zugesetzt und mit Wasser auf gleiches Volum (50 ccm) gebracht. p_H wurde nicht variiert.

Versuch IX: 14. bis 17. VI. 1920. Je 5 g trockener Kalbsknorpel; gepulvert.

p_H	6,7				
$CaCl_2$-Normalität vor V.	0,0136	0,0270	0,0540	0,0810	0,1350
Cl-Normalität nach V	0,0256	0,0332	0,0650	0,0950	0,1576
Ca-Normalität nach V.	0,0138	0,0238	0,0480	0,0638	0,1578
Ca-Bindung	—0,0002	0,0032	0,0060	0,0172	—0,0228
Ca-Bindung in % .	—1,5	11,8	11,1	21,5	—16,9

[1]) Unter Berücksichtigung des Organwassergehaltes.

Digitized by Google

Ergebnis: Bei steigender $CaCl_2$-Konzentration werden absolut und prozentisch steigende Ca-Mengen gebunden, außer in der höchsten Konzentration.

Versuch X: 18. bis 22. VI. 1920. Je 4 g trockener Kalbsknorpel; gepulvert.

	p_H 6,7				
$CaCl_2$-Normalität vor V.	0,0140	0,0280	0,0560	0,0840	0,1400
Cl-Normalität nach V.	0,0220	0,0380	0,0616	0,0930	0,1510
Ca-Normalität nach V.	0,0130	0,0258	0,0382	0,0640	0,1078
Ca-Bindung	0,0010	0,0022	0,0178	0,0200	0,0322
Ca-Bindung in % . .	7,1	7,9	31,8	23,8	23,0

Ergebnis: Wie Versuch IX. Bei den höchsten Konzentrationen prozentische Abnahme der Ca-Bindung.

Versuch XI: 25. bis 29. VI. 1920. Wie Versuch X angesetzt. p_H 6,7. Je 5 g trockener Menschenknorpel.

$CaCl_2$-Normalität vor V.	0,0280	0,0560	0,0840	0,1120	0,1400
Cl-Normalität nach V.	0,0344	0,0590	0,0892	0,1182	0,1290
Ca-Normalität nach V.	0,0212	0,0422	0,0656	0,0840	0,1188
Ca-Bindung	0,0068	0,0138	0,0184	0,0280	0,0312
Ca-Bindung in % . .	24,3	24,6	21,9	25,0	15,1

Ergebnis: In diesem Versuch, in welchem die niedrigste $CaCl_2$-Konzentration nicht zur Anwendung kam, zeigt sich wieder die prozentische Abnahme bei den höchsten Ca-Konzentrationen, während absolut die gebundenen Ca-Mengen zunahmen.

Versuch XII: 3. bis 7. VI. 1920.

p_H 8,1—6,5. Je 15 g frischer Menschenknorpel.

Ca-Cl-Normalität vor V.[1]	0,0128	0,0256	0,0512	0,0768	0,1286
Cl-Normalität nach V.[2]	0,0860	0,0870	0,0968	0,1260	0,1756
Ca-Normalität nach V.	0,0100	0,0132	0,0310	0,0514	0,0960
Ca-Bindung	0,0028	0,0124	0,0202	0,0254	0,0326
Ca-Bindung in % . .	22,0	48,5	39,4	33,0	25,3

Ergebnis: Bei steigender Ca-Konzentration werden absolut steigende, prozentisch zuletzt wieder fallende Ca-Mengen gebunden.

Versuch XIII: 21. bis 24. VI. 1920. Je 15 g frische Gehirnrindenmasse.

	p_H 6,7				
$CaCl_2$-Normalität vor V[1]	0,0116	0,0231	0,0462	0,0694	0,1156
Cl-Normalität nach V.	0,0210	0,0330	0,0570	0,0804	0,1220
Ca-Normalität nach V.	0,0126	0,0254	0,0452	0,0618	0,1048
Ca-Bindung	−0,0010	−0,0023	0,0010	0,0076	0,0108
Ca-Bindung in % . .	−9,0	−9,9	0,23	10,9	9,7

[1]) Unter Berücksichtigung des Organwassergehaltes.

[2]) Infolge des Cl-Gehaltes der Glykokollmischung erhöht.

Digitized by Google

Ergebnis: Erst bei höherer Konzentration tritt Ca-Bindung ein. Prozentisch zeigt sich abermals eine Abnahme bei der höchsten Ca-Konzentration. Niedere Konzentrationen, die bei Knorpel schon Ca-Bindung ermöglichen, sind hier wirkungslos.

IV. Zusammenfassung.

Entsprechend den Ergebnissen Pfaundlers zeigte sich beim Einlegen von Knorpelmasse in $CaCl_2$-Lösungen Ca-Bindung. Diese Bindung ist eine Funktion der Wasserstoffionenkonzentration. Sie wird durch geringe Verschiebungen derselben stark beeinflußt. Bei saurer Reaktion trat geringe oder gar keine Bindung ein, gegen die alkalische Seite zu nahm die Bindung stark zu. Ob außer den H-Ionen noch weitere Kationen, vielleicht auch Anionen, auf die Bindung des Ca einwirken, müssen weitere Versuche entscheiden, die wir uns vorbehalten. Niedrige Ca-Konzentrationen ermöglichen nicht nur absolut, sondern auch prozentisch eine geringere Ca-Bindung als höhere. Bei den höchsten geprüften Konzentrationen trat prozentisch wieder eine Abnahme der Bindung ein. Die Bindung geht bei stark erhitztem, getrocknetem Knorpel schlechter vor sich als in frischem.

Gehirnrinde bindet unter den gleichen Bedingungen Ca, im ganzen wurden aber nicht die Beträge erreicht, die bei Knorpel möglich sind. Die Abhängigkeit von p_H äußert sich darin, daß nur oberhalb p_H 5,5 eine Bindung $> 15\%$ möglich ist. Bei einem alkoholbehandeltem Trockengehirn war bei p_H 5,5 noch Bindung, sehr geringe bei 4,0—4,6. In niedrigen Ca-Konzentrationen fand bei Gehirnmasse überhaupt keine Bindung statt.

Die angeführten Tatsachen schließen eine Deutung der Befunde als Adsorption aus. Es wird angenommen, daß der Ca-Bindung eine Alkaliverdrängung entspricht. Diesem Vorgang wird eine grundlegende Bedeutung für den biochemischen Antagonismus der Alkalien und Erdalkalien beigemessen.

Digitized by Google

Sensibilisierung des Trendelenburgschen Froschpräparates zur Adrenalinmessung.

Von

Th. Alday-Redonnet.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 29. Juli 1920.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

Für die pharmakologische Adrenalintitrierung kommen hauptsächlich zwei Methoden in Frage. Die eine ist die vergleichende Messung der Blutdrucksteigerung nach intravenöser Injektion am Warmblüter, die andere die unmittelbare vasoconstrictorische Wirkung am sog. Trendelenburgschen Präparat.

Die erste gibt für gleiche Mengen Adrenalin stets gleiche Ausschläge an Blutdrucksteigerung, sie ist also hervorragend scharf zu bezeichnen. Sie hat indessen den Nachteil der geringen Empfindlichkeit, d. h. sie verlangt vergleichsweise große Mengen Adrenalin in der Einzelinjektion. Dadurch ist sie für viele Zwecke nicht verwendbar, wie z. B. Messung der constrictorischen Effekte von Mischungen eines Lokalanästhetikums mit Adrenalin, Messung des Adrenalingehaltes im Blut u. a. m.

Die andere Methode ist zwar hervorragend empfindlich, indessen nicht hervorragend scharf. Wiederholte Dosen haben keineswegs stets den gleichen Effekt, das Präparat nimmt im Laufe der Zeit an Empfindlichkeit zu, dann ab, verschiedene Froschpräparate haben oft recht verschiedene Grundempfindlichkeiten, die erfahrungsgemäß zwischen Werten von Adrenalinkonzentrationen $1:10^6$ bis $1:10^9$ schwanken können.

Ziffermäßig läßt sich sagen, daß die Blutdruckempfindlichkeit etwa bei 1 ccm mit einem Gehalt von 0,004 mg Adrenalin liegt, während die Froschbeinmethode mit 0,5 ccm einer Lösung $^1/_{10\,000\,000}$, also im ganzen 0,000 005 mg Adrenalin ihre mittlere Empfindlichkeit hat, d. h. rund 1000 mal empfindlicher ist wie die erstere. Die Messung am ausgeschnittenen Kaninchendarm hat ihr Empfindlichkeitsoptimum etwa beim

Digitized by Google

Mittel der Froschbeinmethode, doch braucht sie wegen der Art des Präparates eine große Menge adrenalinhaltiger Flüssigkeit. (Vgl. dazu P. Trendelenburg Arch. exp. Path. u. Pharmak. 1915, 79, S. 155, und H. Börner ebenda S. 218). Die neuerdings angegebene Methode der intracutanen Injektion von F. v. Gröer (Zeitschr. für d. ges. experimentelle Medizin 7, 1919) steht mit einer Empfindlichkeit von $^1/_{2\,000\,000}$ bis $^1/_{8\,000\,000}$ etwa auf der Höhe der alten Froschbulbusmethode.

Ich habe versucht, die Bedingungen dieser Inkonstanz zu ermitteln und einen Weg zu einem gleichmäßig hochempfindlichen Präparat zu finden.

Nach Lage der Dinge ist die einzige, willkürlich Variable des Systems die Lösung, die das Präparat durchströmt. Diese Lösung pflegt gewöhnlich eine der üblichen Ringer- oder Tyrodelösungen zu sein.

Die physiologische Normalität der Ringerlösung bezieht sich auf die Erhaltung der Funktion des Herz- und Skelettmuskels, das Salzpaar Chlorkalzium-Chlorkalium ist hier antagonistisch wirksam, das Bikarbonat als Regler der H-Ionen-Konzentration.

Danach gliedert sich die Untersuchung in zwei Abteilungen, eine, die sich mit der Bedeutung einer Änderung der Kali-Kalziumkonzentration der Durchströmungslösung beschäftigt, eine zweite, die die Änderung der H-Ionen-Konzentrationen untersucht[1]).

Zur Versuchstechnik ist nur zu bemerken, daß die Messungen an Eskulenten im Sommer 1920 ausgeführt wurden, die modifizierten Durchströmungsflüssigkeiten wurden unter konstantem Druck, der eine optimale Ausflußgeschwindigkeit ermöglichte, während der ganzen Versuchsdauer in Fluß erhalten, die Adrenalindosis[1]) — meist 0,5 ccm einer Lösung $^1/_{10\,000\,000}$, wurde mit peinlichster Sorgfalt so injiziert, daß nach Angabe der beobachteten Mariottesschen Flasche keinerlei Druckänderung in System erfolgte, so daß man sicher sein konnte, daß sich die injizierte Lösung als unveränderte Flüssigkeitssäule durch das Präparat schob.

I. Abteilung. Konzentrationsänderungen in der Durchströmungslösung.

a) Vorversuch.

Es ist bekannt, daß das Froschbeinpräparat vom Momente der Präparation an im Laufe der nächsten Stunden an Empfind-

[1]) Es wurde ausschließlich das synthetische Suprarenin-HCl der Höchster Farbwerke verwendet und zwar in der üblichen Handelspackung der $1\,^0/_{00}$-Lösung.

Digitized by Google

lichkeit zunimmt, etwa nach 2—3 Stunden sein Maximum erreicht und von da ab im Laufe mehrerer Tage an Empfindlichkeit verliert; der Empfindlichkeitsverlust geht erstaunlich langsam vor sich und wird eigentlich praktisch nie Null, denn ich bekam noch nach drei Tagen, als das Präparat sonst schon in starker Fäulnis war, mit $^1/_{100\,000}$ deutliche Adrenalinreaktion.

Wie die Abb. 1 zeigt, ist für das vorliegende Präparat dieses Versuchs die Empfindlichkeit in 2 Stunden so weit, daß mit der Adrenalinlösung $1:10^8$ beträchtliche Ausschläge erhalten werden: ich habe deshalb immer abgewartet, bis eine Minimumempfindlichkeit etwa dieser Größenordnung vorhanden war. Der Versuch zeigt aber auch, daß die Empfindlichkeit im Laufe von 7 Beobachtungsstunden noch sehr beträchtlich zunimmt und stellt damit die in der Folge immer erfüllte Forderung, daß nach den zu studierenden Eingriffen immer wieder die Empfindlichkeit für Normalringer kontrolliert werden muß.

Des weiteren war zuvor die Frage zu klären, ob eine Erhöhung der Salzkonzentration an sich, also eine Steigerung des osmotischen Drucks der Durchströmungsflüssigkeit, von Einfluß ist. Es ergab sich, daß Doppelringerdurchströmung die Empfindlichkeit vermindert, daß aber nach Übergang zu Normalringer die alte Empfindlichkeit sich sofort wiederherstellt. Wenn sich demnach in den folgenden Versuchen bei Änderung des osmotischen Drucks, also der Salzkonzentration, eine Zunahme der Empfindlichkeit ergibt, so ist diese a fortiori als unmittelbare Folge des Eingriffs in das System zu deuten.

b) Kaliwirkung.

Die Durchströmung des Präparates mit Ringerlösung von $1\,^0/_{00}$ Chlorkali ist an sich ohne jeden Einfluß auf die Abtropfgeschwindigkeit (Abb. 2b, anfangs); injiziert man aber in diese an Kali überreiche Lösung Adrenalin, so erweist sich das Präparat als hervorragend sensibilisiert gegen Adrenalin (Abb. 2b). Die Adrenalinwirkung ist an In- und Extensität gewaltig gesteigert. Diese Sensibilisierung ist von längerer Dauer, denn wenn man nach der Durchströmung mit kalireichem Ringer auf Normalringer wieder zurückgeht, ist die Sensibilisierung immer noch beträchtlich, wenn auch von geringerem Grade wie unter unmittelbarer Kaliwirkung (Abb. 2c). Endlich verschwindet sie unter Durchströmung von Normalringer vollständig. (Nicht abgebildet.)

Digitized by Google

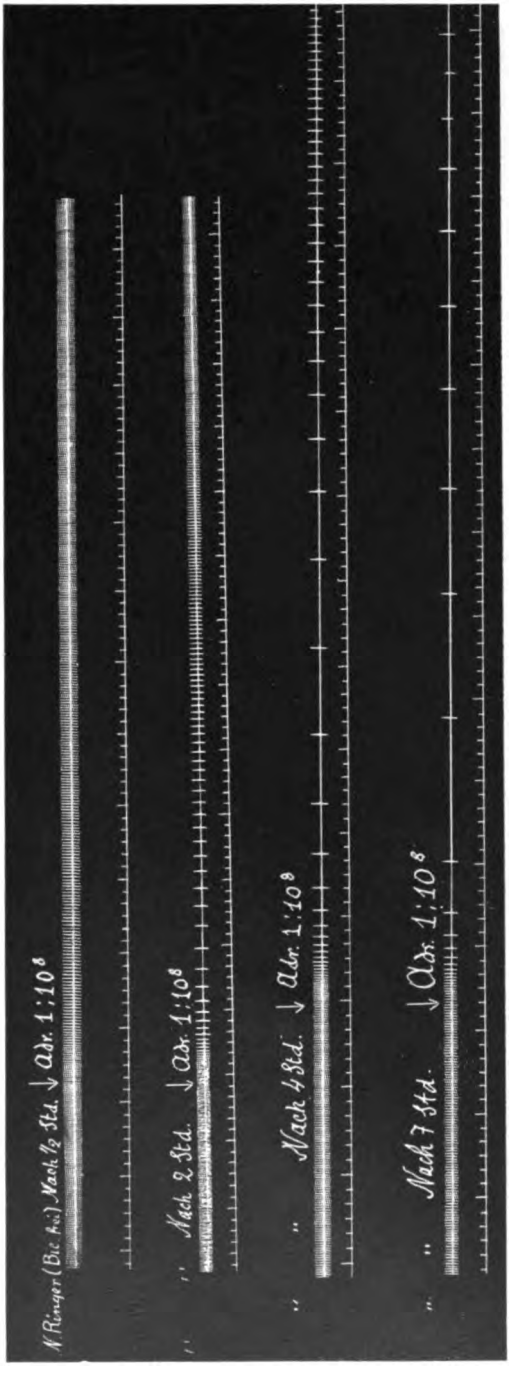


Abb. 1. Zunahme der Empfindlichkeit am Präparate im Laufe von 7 Stunden (Spontanasenalbillisierung).

Digitized by Google

a
b
c
N. Ringer (Bicarb. frei) Nach 15t ↓ Adr. 1:10⁸
N. Ringer (Bicarb. frei) + KCl 1‰ Nach ½5t ↓ Adr. 1:10⁸
N. Ringer (Bicarb. frei) Nach ½ St ↓ Adr. 1:10⁸

Abb. 2. Sensibilisierung durch KCl.

Digitized by Google

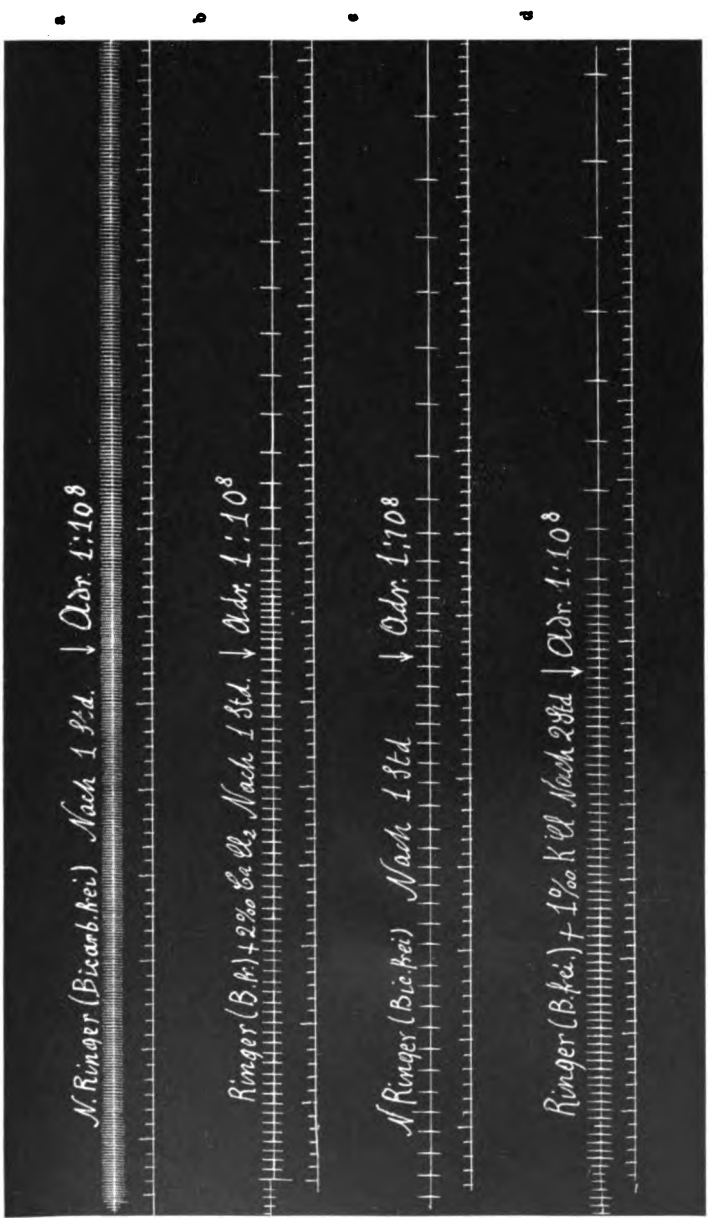

a
b
c
d
N. Ringer (Bicarb. frei) Nach 1 Std. ↓ Adr. 1:10⁸
Ringer (B. fr.) + 2‰ Ca Cl₂ Nach 1 Std. ↓ Adr. 1:10⁸
N Ringer (Bic. frei) Nach 1 Std ↓ Adr. 1:10⁸
Ringer (B. fr.) + 1‰ K Cl Nach 2 Std ↓ Adr. 1:10⁸

Abb. 8. Sensibilisierung durch $CaCl_2$.

Digitized by Google

c) Kalziumwirkung.

Auch für Chlorkalzium ist eine merkliche Sensibilisierung nachweisbar (Abb. 3). Die Kalziumwirkung ist aber komplex, denn dieses Salz versetzt an sich schon das Präparat in einen Zustand der Gefäßtonisierung, die Ausflußgeschwindigkeit wird unter einer Ringerlösung mit einem Plus von 0,2% $CaCl_2$ an sich schon beträchtlich verlangsamt (Abb. 3b, anfangs). Diese Tonisierung und die Sensibilisierung (Abb. 3b) ist von längerer Dauer. Bis zu einem geringen Grade (Abb. 3c) kann die Tonisierung durch Kaliüberschuß aufgehoben werden.

Diese Tonisierungseigenschaft des Kalziums überrascht nicht. Sie dürfte für das gegebene Präparat eine allgemeine Eigenschaft der Erdalkalien sein, denn Stroomann (Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. 1914, *2*, 290) hat für das Chlorbarium in Verdünnung von $^1/_{5000}$ die gleiche Tonisierung (Gefäßdauerkontraktion) nachweisen können. Die Besonderheit bleibt nur die Sensibilisierung. Daß Sensibilisierung und Tonisierung nicht miteinander verknüpft sind, zeigt der Versuch mit Kali, das ja gar nicht tonisiert und sich als starker Sensibilisator erwiesen hat, stärker sogar als Kalzium.

Die Sensibilisierung durch Chlorkali muß an den Erfolgsorganen der Adrenalinwirkung einsetzen, denn an eine chemische Reaktion zwischen Kalisalz und etwa Adrenalinmolekül ist nicht zu denken.

Praktisch kann diese Art der Sensibilisierung von Bedeutung werden, wenn man ein abnorm unempfindliches Präparat in einer Weise sensibilisieren muß, daß weder das physiologische Präparat „unphysiologisch" wird, noch die zu prüfende Substanz in eine Lösung kommt, die sie selbst verändern oder zersetzen könnte.

II. Änderung der H-Ionen-Konzentration.

Bei diesen Versuchen wurde aus der Ringerlösung das Bikarbonat weggelassen und durch die zu prüfenden Säuren und Alkalien ersetzt. Nachdem Kretschmer[1]) vor längerer Zeit gefunden hatte, daß Salzsäure wie in den Handelsflaschen der Lösungen der Nebennierensubstanz so auch im strömenden Blut das Adrenalin konserviert und dadurch die Wirkung einer einmaligen Injektion zeitlich verlängert, lag es nahe, die Acidität

[1]) Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakologie **57**, 438.

Digitized by Google

auch auf einen etwaigen Sensibilisierungseffekt zu prüfen. Das Ergebnis war völlig negativ.

Hingegen gab Steigerung der Alkalescenz durch Zusatz von 0,00001 n-NaOH eine sehr beträchtliche Sensibilisierung (Abb. 4a, b, c). Dieses mir völlig unerwartete Resultat, das aber die gleichartigen Beobachtungen von Gröer und Matula (l. c.) bestätigt, wurde nun genauer unter Variation des Alkalescenzgrades und unter Konstanterhaltung desselben in Puffermischungen verfolgt.

Die Puffermischungen wurden nach den Angaben von Sörensen der nunmehr bicarbonatfreien Ringerlösung oder auch reiner 0,65 proz. Kochsalzlösung zugesetzt. Da, wie oben gezeigt, Erhöhung des osmotischen Drucks eine Herabsetzung der Empfindlichkeit des Präparates für Adrenalin veranlaßt, habe ich die Puffermischungen nicht in der hohen Konzentration Sörensens verwandt, sondern diese auf $^1/_{10}$ vermindert. Sie wurden vor dem Gebrauch mit den einschlägigen Indikatoren kontrolliert. Verwandt

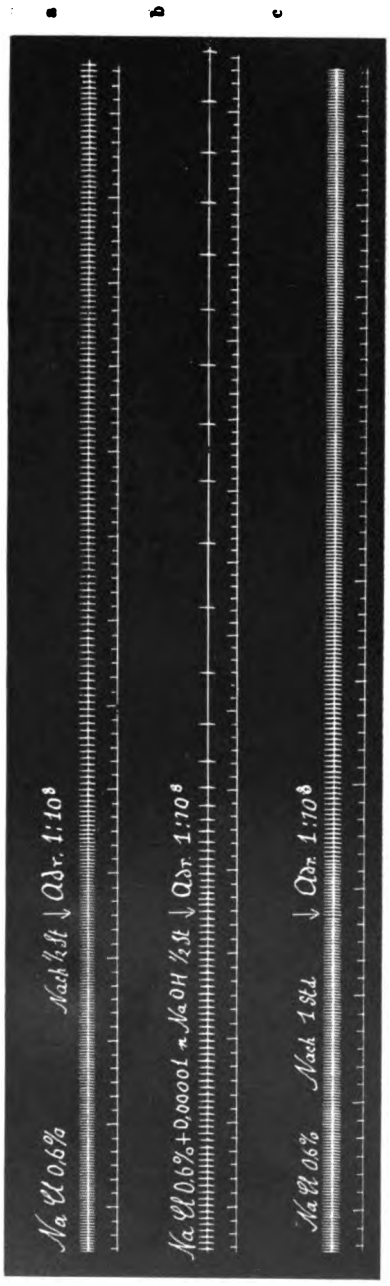


Abb. 4. Sensibilisierung durch Natronlauge.

Digitized by Google

wurden je nach der zu prüfenden H-Ionen-Konzentration die Puffersysteme: Phosphatmischungen (Natronsalze!) für den Bereich $p_H = 10^{-4,9}$ bis 10^{-9}, Ammoniumchlorid-Ammoniak von 10^{-8} bis 10^{-11}, Glykokoll-Natronlauge von $10^{-7,8}$ bis 10^{-12}. Temperatur ca. 18—22°.

Abb. 5 zeigt den sehr bedeutenden Effekt der abnehmenden H-Ionen-Konzentration in Phosphatgemischen. Die Sensibilisierung ist der stärksten Kalisensibilisierung gleichwertig[1]), sie ist der OH-Ionen-Konzentration, also der Alkalescenz, direkt proportional. Die gesteigerte Alkalescenz ist an sich nicht ganz wirkungslos- denn mit ihr parallel gehend tritt eine Tonisierung ein, die Tropfenzahl verringert sich bei der bloßen Durchströmung mit den alkalischen Lösungen ein wenig, wie dies am besten an den berechneten Kurven (Abb. 5, I und IV) zu entnehmen ist. Diese Dauerverkürzung des Gefäßmuskelelementes ist also der beim Kalzium (siehe S. 312) beobachteten Tonisierung gleichartig (d. h. die Tropfzahl von Adrenalin bei IV ist kleiner als bei I). Ihr Grad ist bis zu einem Alkalescenzgrad von $p_H = 10^{-8,04}$ praktisch belanglos, höhere Alkalescenzen bis zu 10—12 können aber auch ohne Adrenalin zu dauerndem Gefäßverschluß führen. Schon das Arbeiten mit $p_H = 10^{-9,18}$ kann wegen der um ca. 30% verlangsamten Tropfenfolge lästig werden. Somit erwiesen sich Alkalescenzen zwischen 8,04 und 9,18 in Form von Phosphatgemischen als am geeignetsten. Die Glykokoll-Natronlaugegemische beeinträchtigen die Adrenalinwirkung an sich (siehe S. 315).

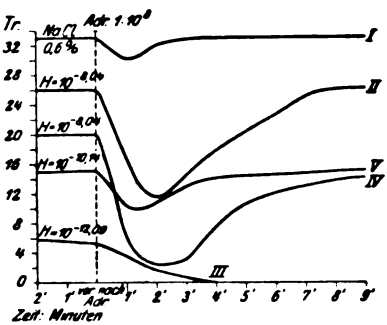


Abb. 5. Sensibilisierung mit steigendem Alkali in Phosphatpuffer. Die Kurven sind durch Auszählen der unmittelbar registrierten Tropffrequenz konstruiert.

Die Tatsache, daß das Optimum der Adrenalinwirkung am Gefäßsystem tief im Bereich der alkalischen Reaktion liegt, ist

[1]) Wenn man an hochgradig sensibilisierten Präparaten sich mit eben deutlich merkbaren Tropfverlangsamungen (Grenzwerten) begnügt, kann man zu exorbitant kleinen Adrenalinmengen, also hohen Empfindlichkeiten gelangen. So bekam ich einmal eine Empfindlichkeitsgrenze von 1: 1000 Milliarden!

Digitized by Google

an sich nicht verwunderlich, und bestätigt nur, was von anderer Seite schon gefunden wurde, daß nämlich alkaloidische Gifte im Blute in Basenform vorhanden sein müssen, um optimal zu wirken. So fand Gros (Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 63, S. 80) für die alkaloidischen Lokalanästhetica eine beträchtliche Verstärkung der Wirksamkeit in bikarbonatalkalischer Lösung.

Merkwürdig ist hingegen, daß in vitro das Adrenalin in den verwendeten Pufferlösungen oxydativ zersetzt und unwirksam wird, in den Phosphatgemengen mit blauer Farbe, in den anderen mit der bekannten kastanienbraunen Tönung. Zur Deutung dieser Erscheinung könnte man an zweierlei denken. Entweder das Adrenalin geht bei meiner Versuchsanordnung in der Perfusionsflüssigkeit nicht zugrunde, da es ja bei der Injektion mit der fließenden Lösung sich nicht mischen darf, oder es ist gerade der Vorgang des Zugrundegehens bzw. die in ihm entstehenden Substanzen, die die Wirkung des Adrenalins überhaupt bedingen. Letzte Annahme würde sich gut in die Straubsche Hypothese vom Potentialgiftcharakter des Adrenalins einfügen.

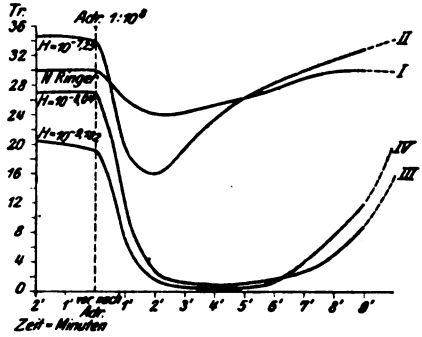


Abb. 6. Sensibilisierung in Glykokoll-Natronlauge (rasche Entwicklung einer Dauerkontraktion).

Zu analoger Erklärung einer Adrenalinwirkung ist auf ganz anderem Wege vor einiger Zeit Oskar Löw gekommen (diese Zeitschr. 85, 1918). Löw fand eine Adrenalinwirkung an Algen, die nicht mit unzersetztem Adrenalin auftritt, sondern erst bei der oxydativen alkalischen Zersetzung dieser Substanz. Er konnte nachweisen, daß bei Gegenwart von Alkali Adrenalin das Methylenblau zu einer farblosen Leukoverbindung reduziert.

Ich konnte diese Reduktion des Methylenblaus in den Pufferlösungen bestätigt sehen und fand noch dazu, daß diese gekuppelte Reduktions-Oxydationsreaktion in den Glykokoll-Natronlaugepuffern stark beschleunigt wird, d. h. das unwirksame Endprodukt des Adrenalins sehr rasch erreicht wird. Damit kann die Beobachtung übereinstimmen, daß mir diese Art von Puffern stets ver-

Digitized by Google

sagte, d. h. daß in ihnen die Sensibilisierung der Adrenalinwirkung nur gering war, weil, wie ich jetzt annehme, das Adrenalin schon bei der Berührung mit dem Puffer zugrunde geht und nicht bei der Berührung mit dem spezifisch empfindlichen lebenden Gewebselement.

Wie eingangs erwähnt und von mir genauer verfolgt, nimmt die Empfindlichkeit des Froschbeinpräparates im Laufe der Zeit beträchtlich zu. Es lag nahe, auch diese Spontansensibilisierung von einer Zunahme der Alkalescenz durch Abgabe von Säure an die Durchströmungsflüssigkeit abhängig zu machen. Von Fletscher ist ja gezeigt (Journal of Phys. Bd. XXIII, 1898), daß der überlebende Muskel in einer ganz charakteristischen Kurve CO_2 abgibt, deren Maximum in der ersten Stunde liegt,

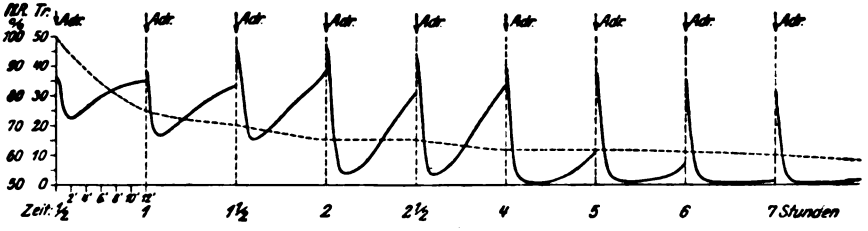


Abb. 7. Die gestrichelte Kurve bedeutet die zunehmende Alkalisierung des Präparates, damit parallel gehend Sensibilisierung gegen Adrenalin 1/10⁸.

die Kurve fällt dann im Laufe von 5—10 Stunden zu einem niedrigen, ziemlich gleich bleibenden Niveau ab, um erst nach 48 Stunden mit eintretender Fäulnis, also durch andere Lebensvorgänge, wieder anzusteigen. Parallel damit geht bekanntlich nach Hill die Wärmebildung im Muskel (Ergebnisse der Physiolcgie 15, 1916). Ganz analog der Zeit nach geht auch die Empfindlichkeitsvariation des Froschgefäßpräparates (siehe oben).

Injiziert man nun statt einer Adrenalinlösung in die fließende einfache Ringerlösung Neutralrot, das in Ringer gelb gefärbt ist, so kann man durch Auffangen der aus der Vene ausfließenden Tropfen sich leicht überzeugen, daß die Lösung rot ausfließt, der Farbstoff also bei der Passage des Gefäßsystems gesäuert worden ist.

Diesen Säuerungsvorgang habe ich nun mit Phosph tpufferlösungen unter Adrenalinwirkung messend verfolgt (Abb. 7).

Es wurde zunächst die 20 Minuten nach der Präparation aus der Venenkanüle ausfließende Lösung mit Neutralrot versetzt,

Digitized by Google

15 ccm mit immer 9 Tropfen meiner Neutralrotlösung. Diese rote Lösung wurde als Vergleichslösung mit dem Werte 100 bezeichnet. Nun wurde während 8 Stunden bei unausgesetzter Durchströmung fortlaufend die Acidität der austropfenden Lösung gemessen, indem im Autenriethschen Kolorimeter die Tönung nach jeweiligem Zusatz von Neutralrot mit dem Ausgangswert messend verglichen wurde. So ergaben sich die in der Abbildung als Prozente des Anfangswertes eingezeichneten Zahlen, z. B. nach 1 Stunde Durchflusses der Pufferlösung 75% (die gestrichelte Kurve).

Alle 30 Minuten wurde nun die Wirksamkeit einer Adrenalinlösung $1:10^8$ gemessen.

Es ergab sich nun tatsächlich, daß mit zunehmender Säurewegspülung die Empfindlichkeit des Präparates gegen den gleichen Adrenalinreiz steigt, oder was dasselbe ist, daß sie steigt in dem Maße, als das Präparat selbst alkalischer wird, das Maximum ist nach 2—3 Stunden erreicht, es bleibt dann bis zu 7 Stunden lange konstant.

Damit erscheint mir nachgewiesen, daß die regelmäßig beobachtete Spontansensibilisierung des Trendelenburgschen Präparates, durch das mit der durchfließenden Ringerlösung bewerkstelligte Wegspülen der im Ruhestoffwechsel des Präparates erzeugten H-Ionen veranlaßt ist; damit findet auch die Sensibilisierung durch Alkali eine Erklärung.

v. Gröer und Matula haben den fördernden Einfluß der alkalischen Reaktion auf eine Adrenalinwirkung in anderem Zusammenhange gefunden. Sie studierten die Wirksamkeitsänderung von Adrenalinlösungen in vitro nach der Zeit und fanden, daß die im allgemeinen hemmend wirkende Alkalilösung von $p_H = 8{,}623$ etwa 2 Stunden nach Zusatz von Adrenalin dieses beträchtlich wirksamer gemacht hat. Die Autoren deuten die Tatsache damit, daß sie annehmen, es würde durch den Alkalizusatz nicht nur die an sich unwirksamere Base frei gemacht, sondern diese selbst würde gewissermaßen chemisch vorbereitet (aber nicht oxydativ), so daß das besonders wirksame Zersetzungsprodukt entstünde. Tatsächlich fanden die Autoren, daß Alkalizusatz unter Wasserstoffatmosphäre die Wirksamkeit des Adrenalins besonders stark fördert. In diesem Punkte berühren sich meine Untersuchungen mit denen der genannten Autoren; sie unterscheiden sich darin, daß die Reaktion, die v. G. u. M. in vitro mit ziemlicher Langsamkeit vor sich gehen sehen, bei mir in das lebende Erfolgsorgan verlegt ist. Der Effekt tritt hier beim gleichen Optimum an p_H jedoch mit größerer Geschwindigkeit ein. Prinzipielle Schlußfolgerungen möchte ich vorerst noch zurückstellen, doch bin ich geneigt, der alkalischen Gewebsstimmung

Digitized by Google

eine größere Bedeutung zuzusprechen als der chemischen Beeinflussung des Adrenalins.

Ergebnisse. 1. Das Adrenalinmeßpräparat nach Trendelenburg läßt sich erheblich sensibilisieren, wenn man der Durchströmungsflüssigkeit 0,1% Chlorkalium mehr zugibt als die Ringerlösung enthält.

2. Den gleichen Effekt hat alkalische Reaktion der Durchströmungslösung.

3. Das Optimum liegt etwa bei $p_H = 10^{-8,5}$ unter Verwendung eines Phosphatpuffers.

4. Die Spontansensibilisierung länger durchströmter Präparate ist die Folge verminderten Säuerungsgrades des Präparates, demnach die Sensibilisierung durch alkalische Puffer die Folge der Neutralisation der an sich weniger gebildeten Säure.

Digitized by Google

Druckfehlerberichtigung

zu dem Beitrag von E. Salkowski „Über die antiseptische Wirkung einiger Chlorderivate des Methans Äthans und Äthylens".

Bd. 107, Seite 198, Zeile 6 von oben lies:

$$\begin{matrix}CHCl\\ \|\\ CHCl\end{matrix} \quad \text{statt} \quad \begin{matrix}CH_2Cl\\ |\\ CH_2Cl\end{matrix}$$

und Seite 199, Zeile 8 von oben lies:

$$\begin{matrix}CHCl\\ \|\\ CCl_2\end{matrix} \quad \text{statt} \quad \begin{matrix}CHCl\\ |\\ CCl_2\end{matrix}$$

Digitized by Google

Autorenverzeichnis.

Alday-Redonnet, Th. Sensibilisierung des Trendelenburgschen Froschpräparates zur Adrenalinmessung. S. 306.

Atzler, Edgar und Erich Döhring. Physikalisch-chemische Beiträge zum Problem der Blutgerinnung. S. 245.

Döhring, Erich s. Atzler.

Fränkel, Sigmund und Karoline Zeimer. Über das Imidazolisopiperidin und seine Derivate. S. 234.

Fränkel, Sigmund und Ernst Nassau. Über ein tryptophanhaltiges Tripeptid aus Casein. S. 287.

Forssmann, J. Der Ursprung des anaphylaktischen Schockes. S. 133.

— Ein neues Krankheitsbild nach Seruminjektionen. S. 164.

Freudenberg, E. u. P. György. Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. I. S. 299.

György, P. s. Freudenberg.

Köhler, Erich. Untersuchungen über den Ablauf der alkoholischen Gärung der Hefe. II. S. 128.

König, Adolf. Untersuchungen über den Einfluß von Temperaturen auf Fermente, besonders von Lab und Pepsin. S. 266.

Kumagawa, Muneo †. S. 217.

Michaelis, L. und M. Rothstein. Zur Theorie der Intervasewirkung. S. 217.

Murschhauser, Hans. Die Mutarotation der Dextrose in Lösungen von sekundärem Natriumphosphat. S. 181.

Nassau, Ernst s. Fränkel.

Negelein, Erwin s. Warburg.

Neuberg, Carl und Werner Ursum. Die dritte Vergärungsform des Zuckers als allgemeine Folge der Dismutationswirkung anorganischer und organischer Alkalisatoren. S. 193.

von Plotho, Olga. Der Einfluß kolloidaler Metallösungen auf niedere Organismen und seine Ursachen. S. 1.

— Der Einfluß der kolloidalen Metallösungen nach Übertragung des Pilzmycels aus verschiedenen Nährsubstraten. S. 33.

Rothstein, M. s. Michaelis.

Rusznyák, Stefan. Physikalisch-chemische Untersuchungen an Körperflüssigkeiten. Der Zustand des Chlors in Serum und Plasma. I. S. 60.

Salén, Ernst. Kolloidstudien über den Bau der roten Blutkörperchen und über Hämolyse. II. S. 176.

v. Szent-Györgyi, A. Eine mikroskopische Überführungsmethode. Studien über Eiweißreaktionen. I. S. 116.

— Die Wirkung der Elektrolyte auf das Serumalbumin. Studien über Eiweißreaktionen. II. S. 119.

Ursum, Werner s. Neuberg.

Warburg, Otto und Erwin Negelein. Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. S. 66.

Weiß, M. Colorimetrische Phenolbestimmung im Harn. S. 258.

Zeimer, Karoline s. Fränkel.

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

STACKS



141711



Digitized by Google